SÉRIE A, N° 3844
N° D'ORDRE:
4695

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean PHILIPPOT

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ÉCHANGES GLOBULO-PLASMATIQUES

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 14 mars 1962, devant la Commission d'examen

MM. WURMSER *Président*
TONNELAT, MOREL } *Examinateurs*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549205_0006

SÉRIE A, N° 3844
N° D'ORDRE:
4695

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean PHILIPPOT

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ÉCHANGES GLOBULO-PLASMATIQUES

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le mars 1962, devant la Commission d'examen

MM. WURMSER *Président*
TONNELAT, MOREL *Examinateurs*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

(Janvier 1962)

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

MM.

G. JULIA .....T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE ....T Théories physiques.
PRENANT .....T Anatomie et histologie comparées.
PÉRÈS .....T Mécanique des fluides et applications.
GRASSÉ .....T Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST .....T Chimie organique.
CHAUDRON .....T Chimie appliquée.
WYART .....T Minéralogie et Cristallog.
TEISSIER .....T Zoologie.
MANGENOT .....T Biologie vég. (Orsay).
AUGER .....T Physique quantique et Relativité.
MONNIER .....T Physiologie générale.
PIVETEAU .....T Paléontologie.
ROCARD .....T Physique (E.N.S.).
CARTAN .....T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE .....T Chimie générale.
FAVARD .....T Géométrie supérieure.
COULOMB .....T Physique du globe.
Mlle COUSIN.....T Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN.....T Chimie minérale.
DRACH .....T Zoologie.
KASTLER.....T Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI .....T Génétique.
RIVIÈRE .....T Géologie S.P.C.N. et Sédim.
GAUTHERET ....T Biologie vég. (P.C.B.).
LUCAS R. .....T Recherches physiques.
THOMAS A. .....T Biologie cellulaire.
ARNULF .....T Optique appliquée.
MORAND.....T Physique Enseignement.
SOLEILLET .....T Physique (P.C.B.).
FORTIER .....T Mécan. expérimentale des fluides.
DANJON .....T Astronomie.
PETIT .....T Biologie maritime.
QUENEY .....T Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN.....T Embryologie.
EICHHORN .....T Botanique.
DE CUGNAC ....T Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS ..T Chimie physique.
THELLIER .....T Physique du globe.
L'HÉRITIER .....T Biologie générale (Orsay).
GRIVET .....T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN .....T Mécanique générale.
DUBREIL .....T Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET .....T Chimie organique.
CAGNIARD .....T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ....T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER .....T Micropaléontologie.
JUNG .....T Pétrographie.
TRILLAT .....T Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN .....T Chimie organique et struct.
JACQUINOT .....T Spectroscop. et Physiq. céleste (Orsay).
VASSY .....T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ....T Théories physiques.
AMIEL .....T Chimie générale.
HOCART .....T Minéralogie et Cristallog.
J.-P. MATHIEU ..T Physiques. (Optique).
COUTEAUX .....T Biol. animale (P.C.B.).
MAY .....T Zoologie (Orsay).
CHOQUET .....T Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN .....T Biologie végétale marine.
GUINIER .....T Physique des solides (Orsay).
JOST .....T Physiologie comparée.
FORTET .....T Calcul des Probabilit. et Physique mathématique.
SCHWARTZ .....T Calcul diff. et intégral.
CHOUARD .....T Physiologie végétale.
MALAVARD.....T Aviation (Techn. Aéronaut.).
BRELOT .....T Calcul différentiel et intégral.
NORMANT .....T Synthèse organique générale.
BENARD .....T Chimie minérale.
BUVAT.....T Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ .....T Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC .....T Psychophysiologie.
ULRICH .....T Physiologie végétale.
MARÉCHAL.....T Optique théorique et appl.
KIRRMANN .....T Théories chimiques.
CHADEFAUD ....T Botanique.
Mlle LE BRETON .T Physiologie de la nutrition.
SALEM .....T Mathématiques générales.
LELONG .....T Applic. de l'analyse à la géom.
DEVILLERS .....T Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN ....T Topologie algébrique.
FRANÇON .....T Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD.....T Géographie physique et Géologie dynamique.
GODEMENT .....T Mathématiques (M.P.C.).
PISOT .....T Tech. mathém. de la Physiq.
ROCH .....T Géologie.
SCHATZMAN ....T Astrophysique.
TERMIER.....T Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY .....T Mathématiques générales.
LENNUIER.....T Physique (M.G.P.).
RIZET .....T Génétique (Orsay).
ROUTHIER .....T Géologie appliquée.
Mme TONNELAT .T Physique théorique.
DIXMIER .....T Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY .....T Chimie générale.
AIGRAIN .....T Électrotechnique générale.
BRUSSET .....T Chimie systématique.

M. Lévy .....T Physique théorique des hautes Énergies (Orsay).
Mme Chaix ....T Chimie biologique.
Mme Hurel-Py Biologie végétale (P.C.B.).
Piaux .....T Chimie (M.P.C.).
Brun .....T Mécan. théorique des fluides.
Lederer .....T Chimie biologique.
Mme Dubreil ..T Mathématiques (Agrég.).
Mme Lelong ..T Mathématiques (E.N.S).
Bellair .....T Géologie (S.P.C.N.).
Cotte .....T Physique électricité.
Dubois J.-E. ...T Chimie organique.
Lamotte .....T Zoologie (E.N.S.).
Michel André .T Chimie minérale (Orsay).
Olmer .....T Énergétique générale.
Rouault .....T Électricité (Orsay).
Gauthier .....T Mécanique appliquée.
Barchewitz ...T Chimie physique.
Brossel .....T Physique atomique.
Buser ..... Physiologie comparée.
Camus..... Physiologie végét. B.M.P.V.
Castaing .....T Physique (Orsay).
Curien .....T Minéralogie et Cristallog.
Moyse .....T Physiologie végét. (Orsay).
Noirot..... Évolution des êtres organisés.
Pannetier ....T Chimie générale (Orsay).
Possompès .....T Zoologie
Pullmann .....T Chimie théorique.
Teillac .....T Physique nucléaire et radioactivité.
Tonnelat .....T Biologie physico-chim.
Ville .....T Économétrie.
Willemart .... Chimie (P.C.B.).
Dode .....T Chimie (Orsay).
Freymann .....T Recherches physiques.
Guinochet ....T Biolog. vég. S.P.C.N. (Orsay).
Rollet .....T Chimie (P.C.B.).
Mlle Josien....T Chimie S.P.C.N.
Chevalley ....T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
Arnoult .....T Électronique (Orsay).
Chapelle.....T Physique (Orsay).
Delange .....T Mathématiques (Orsay).
Deny .....T Mathématiques générales (Orsay).
Germain .....T Mécanique théorique des fluides.
Lucas G. .....T Géologie.
Allard .....T Chimie physique.
Berthelot ....T Physique fondamentale des Hautes Énergies (Orsay).
Bricart .....T Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard. Psychophysiologie.
Friedel ..... Physique des solides (Orsay).
M. Julia ..... Étude des Moléculaires naturelles complexes.
Lender .....T Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
Magat ..... Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin ..T Électrochimie.

Monod.....T Chimie du métabolisme.
Benoit .....T Physiol. anim. (Orsay).
De Possel .....T Analyse numérique.
Charlot .....T Chimie analytique.
Haissinsky .....T Radiochimie.
Lemée.....T Physiol. vég. B.M.P.V. (Ors.).
Guérin .....T Chimie M.P.C. (Orsay).
Chatelet M. ... Chimie (P.C.B.).
Jean .....T Physique nucléaire (Orsay).
Mattler .....T Physique S.P.C.N. (Orsay).
Michel Louis... Physique théor. des Hautes Énergies (Orsay).
Bergerard ..... Zoologie (Orsay).
Bertein..... Electronique (Orsay).
Bouissières .... Chimie des radioéléments (Orsay).
Mme Couture .. Thermodynamique et Mécanique physique.
Ellenberger ... Géologie appliquée s/ le terr.
Franc ..... Biol. animale (P.C.B.).
Schnell ..... Botanique tropicale (Orsay).
Stolkowski .... Physiologie générale.
Acher..... Chimie biol. (Orsay).
Baudoin ..... Biologie animale P.C.B.
Beaumont ..... Biologie animale S.P.C.N.
Blamont ..... Géophysique Ionosphère.
Bourreau ..... Botanique.
Curie D. ..... Physique (M.G.P.).
Durand-Delga . Géologie.
Fréon.....T Chimie organique (Orsay).
Heller ..... Physiologie végétale.
Tortrat ..... Calcul des probabilités.
Cailleux ..... Géologie (S.P.C.N.).
Magnan .....T Physique S.P.C.N.
Daudel .....T Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
Mlle Fourcroy . Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle Veil..... Physiologie générale.
Lwoff .....T Microbiologie.
Siestrunck ....T Mécanique physique et expérimentale.
Lacombe .....T Métallurg. des mét. nucléair.
Brochard .....T Physique (P.C.B.) (Orsay).
Cabannes .....T Mécanique générale.
Lesieur .....T Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
Mazet .....T Mécanique générale (Orsay).
Caire ..... Géographie physique et Géologie dynamique.
Comolet ..... Mécanique des Fluides.
Corabœuf ..... Physiologie animale.
Delloue ..... Physique de l'exosphère.
Gorenflot..... Botanique II (Orsay).
Houillon ..... Biologie animale P.C.B.
Jullien J. ..... Chimie P. C. B.
Malgrange .... Tech. Math. de la Phys.
Olivier..... Antropologie.
Nozeran.....T Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre Physique E. N. S. (Orsay)

Secrétaire général..... R. Poullain.

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur BENEZECH, Professeur à la Faculté de Médecine de MONTPELLIER, que je remercie profondément de l'accueil qu'il m'a ménagé dans son Laboratoire de Physico-Chimie Biologique ainsi que des conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Avec beaucoup de sollicitude Monsieur le Professeur WURMSER a supervisé ce travail dont il a bien voulu admettre l'orientation, au cours de son parrainage au Centre National de la Recherche Scientifique.

Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude. En présidant le jury de ma thèse il témoigne à mon égard d'une grande bienveillance qui est pour moi un encouragement précieux.

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Professeur TONNELAT qui, par ses conseils bienveillants m'a aidé à préciser un certain nombre de points de ce travail concernant les problèmes de diffusion.

J'exprime également ma vive reconnaissance à Monsieur le Professeur MOREL qui a eu l'amabilité, au cours de plusieurs entretiens, de me faire profiter de sa compétence notamment dans le domaine des transports actifs.

- INTRODUCTION -

L'étude qualitative et quantitative des échanges globulo-plasmatiques, qui depuis déjà longtemps a suscité d'innombrables travaux de caractère descriptif, s'est beaucoup plus récemment orientée dans une voie explicative.

Comme pour beaucoup d'autres problèmes biologiques, c'est à l'évènement de nouvelles techniques (celle des isotopes notamment) et à l'introduction de raisonnements physico-chimiques de plus en plus serrés que l'on doit ce changement de méthode de travail qui ne se propose plus, comme unique objectif, la description des faits - si minutieuse qu'elle soit - mais leur interprétation et leur insertion dans des schémas explicatifs cohérents.

Qui dit échanges dans un système biologique hétérogène suppose généralement la présence d'une membrane - ou du moins - d'une surface de séparation, c'est-à-dire pose implicitement l'écrasant problème de la perméabilité en biologie.

Il est bien évident, dans le cas considéré du système globulo-plasmatique, qu'un immense progrès serait réalisé si l'on pouvait définir avec précision les caractères physico-chimiques de la "membrane globulaire" qui n'est ni réellement semi-perméable ni réellement perméable. Au surplus, c'est enfoncer une porte ouverte que rappeler qu'il s'agit d'une membrane vivante dont le fonctionnement se trouve, de ce fait, assujetti à tout un ensemble de réactions métaboliques que l'on commence à peine à déchiffrer.

Mais si le caractère "vivant" de la paroi globulaire complique étrangement son étude, il semble qu'une tentative d'étude des mécanismes membranaires pourrait être la suivante :

Posons en principe que le fonctionnement de la membrane vivante n'exclut pas son fonctionnement comme membrane inerte mais se surajoute. Ainsi la plupart des faits observés ne sont en somme qu'une résultante globale dont l'interprétation est d'une extrême difficulté.

Si donc le fait observé globalement n'est qu'une résultante, on peut en chercher les éventuelles composantes en se plaçant précisément dans des conditions telles que l'une d'entre elles puisse être considérée comme isolée donc plus facile à analyser.

Tel est l'objet de ce travail qui ne décrit aucun fait vraiment nouveau dans le domaine des échanges globulo-plasmatiques. Il s'est simplement proposé de montrer que, suivant les cas, les

érythrocytes se comportent comme des sacs presque rigoureusement semi-perméables, ou bien laissent apercevoir et mesurer de simples phénomènes de diffusion ou bien que les deux faits - osmose et diffusion - se produisant simultanément ou successivement masquent la pureté de l'un et de l'autre, ou bien enfin que la membrane globulaire dite vivante renverse apparemment la physico-chimie classique en montrant des diffusions à priori paradoxales.

On s'est attaché, dans trois parties successives à se placer dans des conditions telles que :

1°) apparaisse un phénomène osmotique pur.
2°) apparaisse un phénomène de diffusion pure (avec ses conséquences).
3°) apparaisse un phénomène "actif" qui, en fait n'est qu'une résultante dont l'analyse montre qu'il comporte toujours une composante "passive" réductible aux deux mécanismes précédents.

- PREMIERE PARTIE -

PHENOMENES OSMOTIQUES

I - INTRODUCTION : POSITION DU PROBLEME

II - ESSAI D'APPLICATION DE LA LOI DE VAN-T'HOFF AUX HEMATIES PLACEES DANS DES SOLUTIONS DE NaCl D'OSMOLARITE VARIABLE

III - PRESSION OSMOTIQUE INTRAGLOBULAIRE ET PRESSION OSMOTIQUE EXTRAGLOBULAIRE : CAS DES SOLUTIONS EXTERIEURES HYPOTONIQUES

IV - REVERSIBILITE DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES HEMATIES

V - GENERALISATION DES RESULTATS PRECEDENTS : OSMOMETRIE COMPAREE DANS DES SOLUTIONS DE DIVERS ELECTROLYTES

VI - LIMITES DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES HEMATIES

VII - CONSEQUENCES GENERALES DE L'ETUDE DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES HEMATIES

I. POSITION DU PROBLEME

A - Généralités -

Lorsqu'un sac à parois rigoureusement hémiperméables de volume V contenant une solution de concentration donnée est mis au contact du solvant, il se développe une pression osmotique p, les grandeurs p et V étant reliées par la loi de BOYLE-MARIOTTE - VAN-T'HOFF : p V = Cte, lorsque l'on a affaire à une solution idéale donc diluée. Il se produit alors un déplacement du solvant vers la solution. Si de même, le sac avec sa solution est mis au contact d'une solution moins concentrée, il y a encore mouvement du solvant vers la solution la plus concentrée.

Soit donc un sac à parois hémiperméables, expansible, de volume V et contenant une solution aqueuse de pression osmotique p_1. Plaçons le dans une solution du même corps ayant une pression osmotique $p_2 < p_1$. Les lois de l'osmose impliquent un passage d'eau vers l'intérieur de telle sorte que la pression osmotique intérieure devienne $p'_1 < p_1$ pendant que la pression extérieure devient $p'_2 > p_2$ avec, à l'équilibre $p'_1 = p'_2$.
Le volume du sac est devenu V' et la loi de VAN-T'HOFF s'exprime alors par l'égalité :

$$p_1 V = p'_1 V' = p'_2 V'$$

ce qui, du point de vue pratique, signifie que, en l'absence de tension de la paroi du sac (1) le volume du sac varie bien en fonction inverse de la pression osmotique extérieure, une fois l'équilibre réalisé.

L'étude du comportement osmométrique des hématies que nous abordons dans ce chapitre consiste à rechercher dans quelle mesure la loi de VAN-T'HOFF est capable de représenter les variations de volume observées par immersion dans des solutions de pressions osmotiques différentes.

On ne peut, à priori, admettre que les conditions nécessaires à l'application de la loi de VAN-T'HOFF sont réalisées ; le problème sera donc abordé en sens inverse. Et si, cette loi se trouve vérifiée sous une forme plus ou moins modifiée, les conclusions en découlant doivent précisément permettre de préciser dans quelle

---

(1) Ce point sera repris plus loin dans l'étude du comportement des hématies (voir p.44)

mesure le comportement des hématies obéit aux lois de l'osmose.

B - Comportement osmotique des hématies - Bref rappel bibliographique.

HAMBURGER (1) (2) à qui l'on peut faire remonter les premières expérimentations sur le comportement osmotique du globule rouge signale que l'on ne peut prendre pour volume "osmotiquement actif" le volume total occupé par l'hématie ce qui, déjà, serait non conforme à l'application intégrale de la loi de VAN-T'HOFF. Cet aspect du problème, qui a fait l'objet de très nombreux travaux parmi lesquels ceux de EGE (3), (4), (5), (6), LUCKE et CUTCHEON (7) PONDER (8) BENEZECH (9), (10), s'introduit inéluctablement car le contenu du globule rouge ne peut être considéré comme une solution diluée.

HAMBURGER lui-même considère l'hématie comme un"échaffaudage" osmotiquement inactif, entre les parties duquel circule le liquide intracellulaire qui seul intervient dans les échanges osmotiques. Cette représentation s'apparente d'ailleurs à celle que PONDER (8) propose pour expliquer le comportement osmotique anormal des hématies (apparente "gélation" du contenu globulaire).

Quoiqu'il en soit du milieu intracellulaire, le volume "osmotiquement actif" c'est-à-dire le volume qui pourrait à la rigueur être mobilisé sous la pression des forces osmotiques sera donc représenté par la différence entre le volume "total" de l'hématie et le volume de la phase dispersée contenant des substances à effet osmotiquement négligeables comme les protéines, les lipides... On peut alors envisager d'appliquer la loi de VAN-T'HOFF aux hématies à la condition d'utiliser le "volume osmotiquement actif".

L'expression même de "volume osmotiquement actif" est équivoque ; sa définition précise est difficile ; il est, en effet, hors de doute que ce volume est inférieur à l'eau totale contenue dans les hématies ce qui suggère qu'une fraction non négligeable de l'eau n'interviendrait pas dans les échanges osmotiques d'où l'expression classique "d'eau liée" qui soulève, elle aussi, de multiples problèmes.

Les résultats sont d'ailleurs loin d'être concordants à ce sujet et, comme le dit PONDER (8) à propos de l'eau liée : "L'accord semble se faire sur le fait que la notion d'eau liée repose sur sa propre définition et sa méthode de mesure". (Voir aussi BLANCHARD (11)).

C'est ainsi que si l'on compare les pourcentages d'eau liée indiqués au cours de mesures ayant utilisé les phénomènes os-

-motiques on note de sérieuses différences entre les résultats expérimentaux. (Tableau I)

TABLEAU I

EAU LIEE (p.100 du vol.glob.)	AUTEURS	REFERENCES
0 à 5	EGE	(12)
0 à 5	SCHIODT	(13)
14	SLAVINSKY	(14) (15)
18	CRISTOL - BENEZECH	(16) (17) (18) (19) (20) (21) (22)
30 à 35	GOUGH	(23)
30 à 35	KREVISKY	(24)
30 à 35	PONDER et SASLOW	(25) (méthode de STEWARD) (26) (27)

Ces résultats sont même différents chez le même auteur selon la méthode utilisée. Ainsi a pu être admise l'existence "d'eau solvante" (PONDER, NICLOUX) ; cette eau serait en somme l'eau telle que nous la connaissons et manipulons et s'opposerait à une fraction de l'eau cellulaire qui aurait perdu tout ou partie de son pouvoir solvant par suite des liaisons contractées avec les macromolécules du milieu intra-cellulaire.
Cela ne signifierait d'ailleurs pas, selon Mc LEOD et PONDER (28) que les deux notions d'eau non solvante et d'eau liée puissent être confondues. Car, parler d'eau non solvante indique avec précision l'absence d'une propriété définie de l'eau, et parler d'eau liée ne fait qu'indiquer la possibilité de liaisons des molécules d'eau avec divers groupements polaires. Que le premier fait soit la conséquence du second (en supposant l'exactitude de cette dépendance) n'autorise pas à les confondre.

Ceci dit, la plupart des auteurs substituent à l'équation de VAN T'HOFF - BOYLE - MARIOTTE l'équation suivante :

$$p\ (V - b) = C^{te}$$

dans laquelle $V - b$ est la fraction de volume globulaire osmotiquement utilisable.

Moyennant cette adaptation, il semblerait que l'on puisse parler du globule rouge comme d'un osmomètre.

Cependant, dès 1889 on connaissait les transferts anioniques globulo-plasmatiques (HAMBURGER (29) (30) (31) (32). Et en 1930, HILL et KUPALOV (33) mettaient en doute l'hémiperméabilité de la membrane, toujours dans le même but d'expliquer le comportement osmotique anormal des globules rouges.

Si l'étude expérimentale (PONDER et ROBINSON) (34), DAVSON (35), ABELS (36), JACOBS et PARPART (37), PONDER (8) (38) n'a pu rendre compte en totalité de cet "effet de Sel", elle a néanmoins montré l'insuffisance des phénomènes osmotiques. Au transfert de solvant se superpose un transfert ionique dont le mécanisme relève des phénomènes de diffusion.

L'interférence de ces deux groupes de faits est d'ailleurs bien mis en lumière par la monographie relativement récente (1956) de HARRIS (39) qui, dans un cadre beaucoup plus général que celui des hématies discute l'importance des phénomènes osmotiques, des phénomènes de diffusion et aussi des phénomènes actifs sur lesquels nous reviendrons.

Dans les remarques précédentes il n'a pas été précisé le rôle éventuellement joué par les constituants globulaires eux-mêmes et particulièrement par l'hémoglobine. De façon plus générale, la composition du globule étant ce qu'elle est, peut-on admettre qu'il y a équilibre osmotique entre l'hématie et son milieu extérieur ?

Certes BRODSKY (40), et tout récemment WILLIAMS et ses collaborateurs (41) ont montré par des méthodes cryométriques que l'on pouvait considérer cet équilibre comme réalisé, dans un intervalle de pression osmotique allant de 212,5 à 521,5 mosm. (i.e. de Δ = - 0,39°C à Δ = - 0,96°C). Cela ne permet pas pour autant de confondre pression à l'intérieur et à l'extérieur du globule et de prendre la mesure de l'une pour la mesure de l'autre dans tous les cas. Après BENEZECH (9) nous nous attacherons en effet à souligner le rôle de la membrane et de sa tension mécanique en milieu hypotonique ; on est ainsi conduit à discuter la légitimité de l'application des lois de l'osmose dans ce cas.

Mais WILLIAMS et ses collaborateurs, suivis en cela par d'autres chercheurs comme DICK (42) (43), DICK et LOWENSTEIN (44) (45), DRABKIN (46) reprenant une ancienne théorie d'ADAIR (47) concluaient que l'hématie était un "osmomètre parfait" à condition de tenir compte des variations apportées au coefficient osmotique de l'hémoglobine par dilution. Il ne semble pas que cette restriction suffise à expliquer toutes les anomalies constatées et si une part est faite à l'eau liée (hydratation de l'hémoglobine), l'imprécision même avec laquelle l'eau liée (si elle existe) peut être

mesurée rend incertaine toute conclusion rigoureuse.

Quoiqu'il en soit, la remarque de PONDER (38), à la suite de la publication d'ADAIR reste fondamentale : le rôle de l'hémoglobine est une illustration frappante de l'erreur que l'on pourrait commettre en pensant que de simples relations osmotiques peuvent rendre compte du comportement de systèmes aussi concentrés que le milieu intra-cellulaire des globules rouges.

En possession de ces résultats, le but poursuivi dans ce chapitre est le suivant :

1°) Etudier comment varie le volume globulaire (V) en fonction de la pression osmotique extérieure (p) c'est-à-dire rechercher la représentation algébrique et graphique de la fonction :

$$V = f(p)$$

Pour que cette étude ait un caractère assez général, elle doit être faite avec toute une série de solutions dont le soluté - à priori peu ou pas diffusible - sera variable. Il s'agit de savoir si un comportement général purement osmotique peut être défini qui, moyennant la seule restriction de non diffusibilité, ne dépende pas de la nature de la solution, et dans quelles conditions cela est possible.

2°) On se propose, dans le cas d'hématies placées en solution hypotonique, de montrer que le gonflement c'est-à-dire une sorte de tension mécanique de la membrane limitant les hématies empêche l'application d'une loi osmotique.

3°) Le cas de l'hypotonie est particulièrement intéressant car il doit permettre de recouper les éventuels résultats de la première partie en étudiant la résistance osmotique des hématies dans des solutions de nature différente mais équivalente osmotiquement. Dans le cas de phénomène osmotique (c'est-à-dire uniquement de transfert d'eau), la résistance osmotique doit être la même quelle que soit la nature de la solution.

II - ESSAI D'APPLICATION DE LA LOI DE VAN-T'HOFF AUX HEMATIES PLACEES DANS DES SOLUTIONS DE NaCl D'OSMOLARITE VARIABLE

1) Principe général

Des hématies, séparées de leur plasma par centrifugation, sont mises en suspension dans des solutions de NaCl d'osmolarité variable p ; le volume cellulaire V varie. Il s'agit d'étudier algébriquement et graphiquement la fonction :

$$V = f(p)$$

2) Schéma des expériences réalisées

Du sang de cheval défibriné ou hépariné est directement centrifugé à 5000 g dans des tubes à hématocrite (soit des tubes de capacité 1 ml, gradués au 0,01 ml, soit des tubes de capacité 5 ml, gradués en 0,1 ml). On note le volume globulaire Vo (1). Le volume de sérum surnageant est enlevé aussi rigoureusement que possible et remplacé par un égal volume de solution de NaCl d'osmolarité connue. Les hématies sont remises en suspension et abandonnées à l'abri de toute évaporation, à la température du laboratoire durant un temps variable (1) selon les cas.

3) Remarques concernant le protocole expérimental

a) Expression de l'osmolarité des solutions utilisées

L'osmolarité des solutions de NaCl est exprimée par l'abaissement cryoscopique ; les valeurs extrêmes utilisées sont $\Delta = -0,4°C$ (légèrement inférieure à l'osmolarité du sérum normal) et $\Delta = -1,5°C$ (près de 3 fois l'osmolarité du sérum). Des osmolarités supérieures peuvent être utilisées, allant jusqu'à $\Delta = -3°C$; mais l'expérience montre que les variations de volume cellulaire correspondantes restent très faibles (pour ne pas dire négligeables) au delà de $\Delta = -1,5°C$. On n'a donc pas intérêt à utiliser ces concentrations de plus en plus lésantes pour l'hématie.

---

(1) On indique, quelques lignes plus bas, la justification de ces conditions expérimentales.

- On appelle solution "hypo-osmotique" une solution dont l'abaissement cryoscopique sera inférieur à celui du plasma.
- On appelle solution "hyper-osmotique" une solution dont l'abaissement crysocopique sera supérieur à celui du plasma.
La préparation des solutions d'osmolarité donnée est réalisée en déterminant graphiquement la valeur de la concentration correspondante au moyen de la courbe : abaissement cryoscopique - concentration (fig.1) qui est une droite, dans les limites utilisées.

b) Conditions de séparation des hématies et du liquide surnageant

La vitesse de centrifugation est toujours la même 6000 à 6.500 tours/minute ce qui correspond environ, avec un rayon de rotation de 12 cm, à un champ centrifuge de 4.800 à 5000 g.

Le problème posé est de savoir si le volume globulaire mesuré dans ces conditions est suffisamment voisin du volume globulaire vrai, déduction faite du plasma inter-cellulaire. Il est bien évident qu'en toute rigueur, on ne peut ainsi connaître la valeur exacte de ce volume puisque, PARPART et BALLANTINE (48) l'ont montré, la valeur mesurée diminue lorsque le champ centrifuge augmente et cela jusqu'à des accélérations allant jusqu'à 19.10^5 g.

Néanmoins, il est possible par diverses méthodes (diffusion de colorants, d'inuline..., emploi de protéines marquées...) de déterminer le volume de plasma inter-cellulaire (plasma"piégé"). JACKSON et NUTT (49) ont ainsi montré que, pour des champs centrifuges de l'ordre de 1.500 g, les volumes piégés ne sont pas négligeables. Par contre, au dessus de 4000 g, les mesures de volume globulaire sont satisfaisantes, le volume de plasma piégé ne dépassant pas 2 p.100 (x). Cela étant, la méthode dite à l'hématocrite, peut être utilisée dans les conditions expérimentales adoptées d'autant que les mesures ont généralement été des mesures relatives.

c) Temps de contact des hématies et des solutions de remplacement

Bornons-nous, pour l'instant à noter que la plupart des expériences ont été faites après des temps de contact de 1 à 3 heures (pour des raisons de commodité lorsqu'il est nécessaire d'opérer simultanément sur un assez grand nombre d'échantillons).

La figure 2 montre que, pour des osmolarités extérieures comprises entre Δ = - 0,5°C et Δ = - 1,2°C, la contraction glo-

---

(x) L'hémolyse toujours à craindre pour des champs centrifuges élevés, ne s'est produite que rarement aux vitesses utilisées dans les expériences.

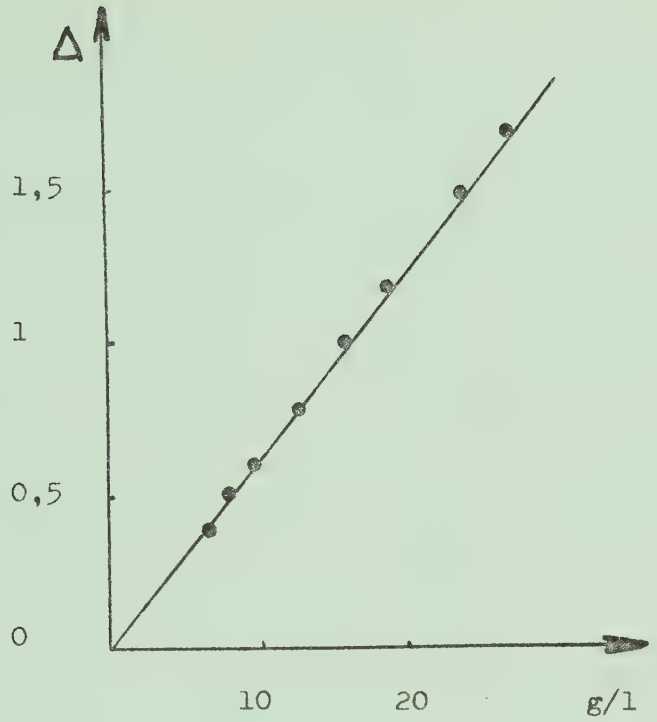


Figure 1 : Courbe "type" : Abaissement cryoscopique - Concentration, construite avec des solutions de NaCl. (Dans la majorité des cas, la linéarité est trés satisfaisante)

Remarque générale : Sur les figures et les tableaux, on exprimera les abaissements cryoscopiques (Δ) en valeur absolue afin de faciliter la lecture des résultats souvent exprimés en fonction de l'accroissement de la pression osmotique développée dans le milieu exterieur, qui sera donc représenté par l'accroissement correspondant de la valeur absolue du Δ extraglobulaire.

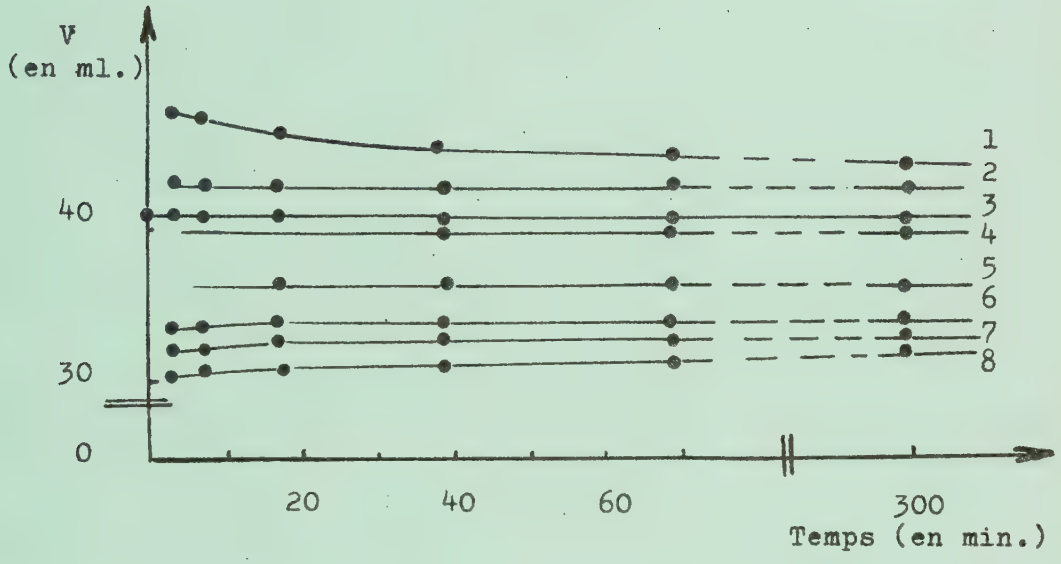


Figure 2 : Variations en fonction du temps du volume d'hématies placées dans différentes solutions de NaCl de tonicité variable: courbe (1) Δ = 0,4 ; (2) 0,5 ; (3) 0,56 ; (4) 0,6 ; (5) 0,8 ; (6) 1 ; (7) 1,2 ; (8) 1,5 .

-bulaire obtenue est pratiquement instantanée et constante, dans le temps. Par contre, si l'osmolarité de la solution extérieure est plus élevée, on observe, avec le temps, une augmentation du volume globulaire (c'est-à-dire une diminution de la contraction précédemment obtenue). Le problème sera d'ailleurs discuté ultérieurement (p.31), compte tenu des recherches de SIDEL et SOLOMON, et de notre propre expérimentation.

Les conditions expérimentales ainsi définies sont aussi peu biologiques que possible. Nous verrons ultérieurement comment elles doivent être modifiées pour l'étude des transferts actifs. Dans le cas présent, il s'agit exclusivement de créer un très important déséquilibre osmotique entre milieu intra-globulaire et milieu extra-globulaire et de noter les variations de volume observées.

4) Expression et représentation des résultats expérimentaux

Si nous traçons, à partir des résultats expérimentaux, la courbe $V = f(p)$, nous obtenons une courbe à allure hyperbolique représentant les variations du volume globulaire (rapporté à 100 ml de sang total) en fonction des pressions osmotiques exprimées en abaissement cryoscopique.

La nature de cette courbe peut être précisée en construisant le graphique :

$$V = f\left(\frac{1}{p}\right) \qquad (1)$$

avec les valeurs numériques ci-dessous :

TABLEAU II

p (en Δ)	1/p	V (ml)
0,6	1,66	47,5
0,8	1,25	43
1	1	40,5
1,2	0,83	38,5
1,5	0,66	36,5

Les points représentatifs sont correctement alignés (fig.3) comme nous le verrons et correspondent à une relation du type :

$$V = \frac{a}{p} + b \qquad (2)$$

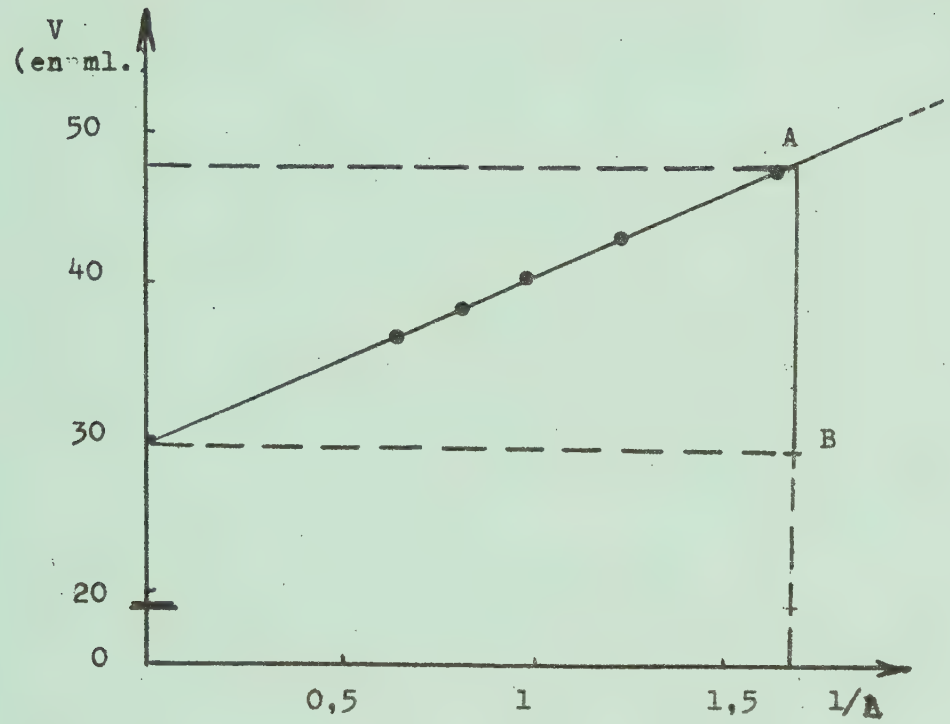


Figure 3 : Variations du volume des hématies (V) en fonction de l'inverse de la pression osmotique extra-globulaire (Δ est exprimé en degré centigrade)

En effet, les points de la figure 3 permettent de définir une droite dont les paramètres a (pente de la droite) et b (ordonnée à l'origine) sont déterminés graphiquement à partir des résultats expérimentaux précédents. Leurs valeurs numériques qui dépendent des unités adoptées (volumes en ml, pression osmotique exprimée en abaissement cryoscopique) sont ainsi :

$$a = 10,6$$

$$b = 29,6$$

Le terme b représente la valeur du volume globulaire correspondant à une pression extérieure infiniment grande (donc impossible à réaliser expérimentalement). L'expression (V - b) représente donc, pour chaque valeur de p, le volume d'eau transférable demeurant dans les hématies. De sorte que, le volume maximum transférable est représenté par la différence :

$$V_o - b$$ (segment AB de la figure 3)

5) Discussion

Ainsi la totalité du volume globulaire n'intervient pas dans ce transfert (ce qui était d'ailleurs évident "à priori") puisque la totalité du volume globulaire n'est pas remplie d'eau. Mais de plus, les données numériques obtenues ($(V_o - b)$ est de l'ordre de 20 ml) montrent qu'il n'y a guère plus de 50 à 60 p.100 de l'eau totale des hématies qui est mobilisable par les forces osmotiques.

En effet :

$$V_o = 48 \text{ ml p.100 ml de sang}$$

$$b = 29,6$$

$$V_o - b = 48 - 29,6 = 18,4 \text{ ml}$$

Eau totale des hématies = 66 p.100 (x) soit, pour 48 ml :

$$48 \times 0,66 = 32 \text{ ml}$$

La quantité d'eau maxima transférable est donc :

$$\frac{18,4 \times 100}{32} = 57,5 \text{ p.100}$$

(x) Cette valeur a été vérifiée à plusieurs reprises dans cette étude par dessication totale à l'étuve (110°C) d'un poids connu de globules.

Le problème du transfert de l'eau des hématies sous les influences osmotiques a suscité, comme nous l'avons déjà dit, de nombreux travaux (GOUGH (23), EGE (3, 4), SCHIODT (13), KREVISKY (24), CRISTOL et BENEZECH (16)...). Malgré des divergences, tenant à des conditions expérimentales diverses, à l'emploi de substances plus ou moins diffusibles, il est unanimement constaté que l'eau transférable sous l'action de forces osmotiques élevées (théoriquement infinies) est largement inférieure à l'eau totale. Ce qui revient à dire que l'hématie prise dans sa totalité n'est pas un osmomètre. Tout se passe comme si une certaine fraction de l'eau intra-globulaire se trouvait sous un état physique particulier empêchant sa mobilisation.

Ce terme d'eau "liée" ("BOUND WATER" des anglo-saxons, GEBUNDENES WASSER des auteurs allemands) souligne ce que l'on peut appeler cette anomalie de comportement d'une partie de l'eau globulaire. Des explications diverses ont été proposées pour interpréter l'eau liée. La plupart d'entre elles font intervenir la réactivité de macromolécules diverses (protéines notamment) ayant la propriété d'adsorber plus ou moins solidement une certaine quantité d'eau et de la rendre de ce fait non transférable.

La relation (2) précédente, qui peut s'écrire :

$$p\ (V - b) = a \qquad (3)$$

peut être considérée comme l'application, au volume (V - b), de la loi de VAN T'HOFF ; elle rappelle l'équation de VAN DER WAALS appliquée aux gaz réels tenant compte du covolume intervenant aux fortes pressions ; elle est identique à la relation appliquée par SACKUR (50) aux solutions dans lesquelles b représente précisément la valeur que prend le volume pour les pressions très grandes.

Mais une remarque s'impose : quelle est la signification exacte de la pression p figurant dans cette relation ? C'est ce qui va être maintenant précisé.

III - PRESSION OSMOTIQUE INTRA-GLOBULAIRE ET PRESSION OSMOTIQUE EXTRA-GLOBULAIRE : CAS DES SOLUTIONS EXTERIEURES HYPOTONIQUES

1 - Généralités

Dans l'expression précédente assimilée à la loi de VAN-T'HOFF, si (V - b) représente le volume de liquide transférable sous l'action des forces osmotiques, p désigne, en toute rigueur, la pression osmotique existant "dans" le volume V - b, du fait de l'existence en solution d'un certain nombre de particules. Or, dans l'expérimentation précédente, p représente la pression osmotique "extérieure". A-t-on le droit d'assimiler l'une à l'autre ?

De façon générale, si un sac formé d'une membrane hémiperméable, contenant des particules en solution est en équilibre avec le milieu extérieur, les conditions strictes de l'équilibre doivent tenir compte :

- de la pression osmotique extérieure : p_e
- de la pression osmotique intérieure : p_i
- de la tension mécanique de la membrane limitante : p_m, ce qui aboutit à l'équation :

$$p_i + p_m = p_e \qquad (4)$$

ce n'est qu'à la condition expresse : $p_m = 0$ ou $p_m \simeq 0$ que l'on peut admettre que $p_i = p_e$.

L'aspect crénelé que prennent les globules rouges placés dans des solutions nettement hypertoniques indique l'annulation de cette tension ($p_m = 0$). Dans ce cas, et dans ce cas seulement, les pressions osmotiques extérieure et intérieure peuvent être confondues.

Le cas des hématies en suspension dans des solutions hypotoniques est donc plus complexe, puisqu'on peut à priori supposer que la loi de VAN-T'HOFF ne s'applique plus.

Voici comment le problème peut être abordé.

2 - Faits expérimentaux

Nous reprenons l'étude de la fonction $V = f(1/p)$ en étendant l'intervalle de variations jusqu'aux valeurs minima de pression osmotique compatible avec l'absence d'hémolyse appréciable, c'est-à-dire pratiquement $\Delta = -0{,}3°C$, ce qui réalise une nette hypotonie.

Voici les résultats (Tableau III).
(Les volumes globulaires sont toujours exprimés par rapport à 100 ml de sang)

TABLEAU III

Δ	$\frac{1}{\Delta}$	V	Δ	$\frac{1}{\Delta}$	V
1,5	0,66	44	0,5	2	58
1,2	0,83	46	0,45	2,22	59
1	1	47	0,40	2,5	62
0,8	1,25	50	0,35	2,85	64
0,56	1,78	56	0,325	3,07	65
			0,30	3,33	67

La représentation graphique de ces données numériques conduit à la figure 4 qui montre les faits suivants :

- a) Pour les pressions osmotiques supérieures ou égales approximativement à l'isotonie (Δ =-0,5°C), le volume globulaire est une fonction linéaire de 1/p (résultat acquis antérieurement).
- b) Pour Δ <-0,5°C, les points représentatifs s'écartent de la droite précédente : c'est dire que la loi de VAN-T' HOFF ne s'applique plus.

On peut alors rattacher ce dernier fait à l'existence d'une tension mécanique et calculer celle-ci de la façon suivante :

3 - Calcul de la tension mécanique des hématies

Considérons par exemple (Fig.4) le point A de la courbe représentative : il correspond à un volume globulaire de 64,4 ml et à un abaissement cryoscopique de la solution extérieure de - 0,35. Or, si la loi de VAN-T'HOFF s'était appliquée, l'abaissement cryoscopique correspondant à ce même volume serait l'abcisse du point B soit :

$$\frac{1}{\Delta} = 2,54 \quad \text{et} \quad \Delta = 0,39°C$$

La différence 0,39 - 0,35 = 0,04 exprime (en abaissement cryoscopique) la tension mécanique.

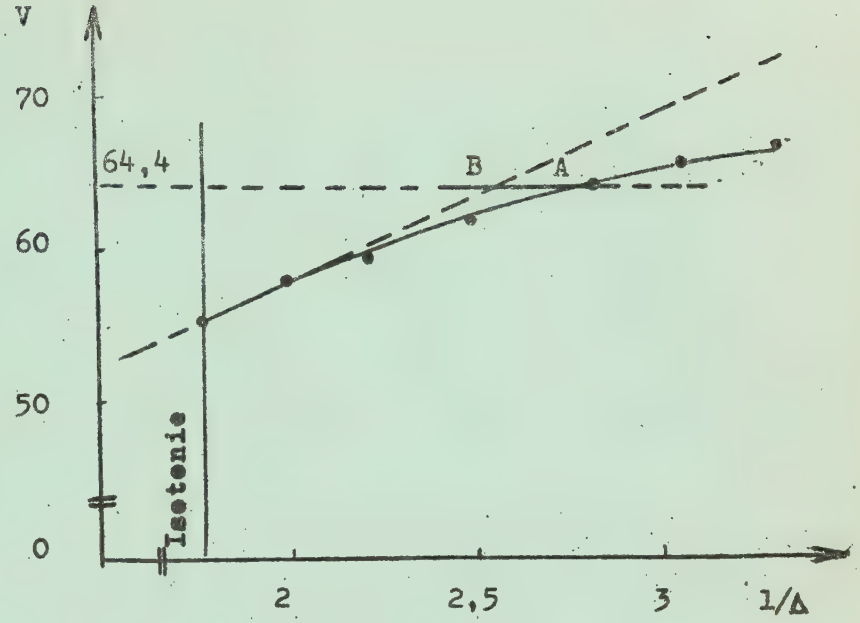


Figure 4 : Variations du vol. d'hématies placées dans des solutions hypotoniques de NaCl, en fonction de l'inverse de la pression osmotique développée par ces solutions (exprimée en $1/\Delta$).

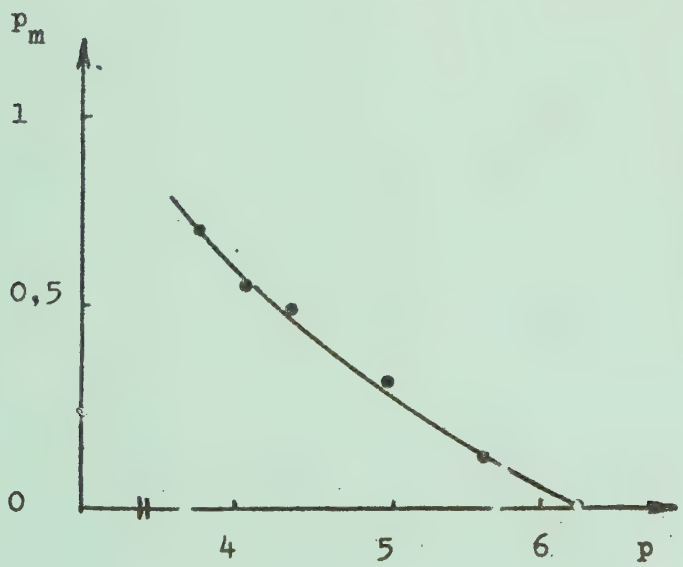


Figure 5 : Variations de la Tension Mécanique (p_m) en fonction de la pression osmotique du milieu exterieur (exprimées toutes deux en Atmosphères)

Traduisons ces résultats en unités de pression, par exemple en atmosphères :

$$p_{atm} = 12,5\ \Delta \qquad (\text{à } 15°C)$$

Pour $\Delta = 0,35$ $\quad p_1 = 12,5 \times 0,35 = 4,375$ atm

Pour $\Delta = 0,39$ $\quad p_2 = 12,5 \times 0,39 = 4,875$ atm

D'où la tension mécanique :

$$p_m = p_2 - p_1 = 4,875 - 4,375 = 0,5 \text{ atm.}$$

De sorte que la pression d'origine mécanique (p_m) se définit expérimentalement comme étant la différence entre la pression osmotique (p_2) qui serait la pression associée théoriquement au volume observé (si la loi de VAN-T'HOFF s'appliquait) et la pression (p_1) qui correspond effectivement à ce volume

$$p_2 \text{ étant } > p_1$$

On est ainsi conduit au tableau suivant (Tableau IV)

TABLEAU IV

Volume globulaire V = (ml)	Δ	p_1 (atm)	p_2 (atm)	$p_m = p_2 - p_1$
58	-0,5	6,250	6,250	0
59	-0,45	5,625	5,750	0,125
62	-0,40	5	5,3125	0,312
64	0,35	4,375	4,875	0,500
65	0,325	4,0625	4,625	0,560
67	0,30	3,750	4,460	0,710

4 - Variation de la tension mécanique

A priori, la tension mécanique est d'autant plus grande que la pression osmotique extérieure s'éloigne davantage de l'isotonie (sans atteindre l'hémolyse).

La figure 5 donne une représentation graphique de ces résultats.

IV - REVERSIBILITE DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES HEMATIES

On appellera état initial l'hématie dans son plasma, donc caractérisée par un volume V_o. Les chapitres précédents ont montré que, lorsque la pression osmotique extérieure augmente, la variation de volume est, avec une assez bonne approximation, une fonction hyperbolique de la pression.

Appelons V_f le volume globulaire correspondant à la valeur la plus élevée de la pression osmotique ($\Delta \simeq -1,50°C$). Etant donné la continuité de la courbe représentative, le problème abordé dans ce chapitre consiste à inverser l'expérience. Supposons que le volume initial de l'hématie soit maintenant V_f c'est-à-dire celui obtenu après équilibre dans une solution hyper-osmotique; on va rechercher quelles seront les variations de volume observées lorsque la pression osmotique extérieure prendra des valeurs de plus en plus faibles. Il s'agit de savoir si le volume final mesuré dans ces conditions est voisin de V_o et si la courbe représentative ainsi obtenue se superpose à celle que nous avons déjà indiquée.

S'il en est ainsi, on concluera que les modifications de volume consécutives aux variations de pression osmotique sont réversibles.

Deux types d'expériences ont été réalisées :

I - On prépare des "hématies hypertoniques" par séjour dans des solutions fortement hypertoniques ($\Delta = -1,5°C$). La contraction globulaire est importante. Ces hématies sont ensuite séparées de la solution extérieure et placées dans des solutions de tonicité variable inférieure à la solution initiale. Le nouveau volume globulaire est mesuré et on peut ainsi, par points, construire la courbe $V = f(p)$.

II - On prépare des hématies de "tonicité variable" mais à divers degrés par immersion dans des solutions hyper ou hypotoniques s'échelonnant entre $\Delta = -0,4$ et $\Delta = -1,5°C$. On obtient ainsi une série d'échantillons globulaires dont les volumes ont des valeurs variables. Chacun d'entre eux séparé de sa solution est placé dans le plasma d'origine et on note le nouveau volume.

Voici quelques modalités expérimentales ainsi que les résultats obtenus, dans chaque série d'expériences.

Ière Série d'expériences -

Préparation"d'hématies hypertoniques" remises en suspension dans des solutions de tonicité variable.

A) Un volume V_0 de globules rouges est mis en suspension dans un volume $(5 - V_0)$ ml de solution de NaCl hypertonique ($\Delta = - 1,5$). Après 3 minutes de contact, et centrifugation durant 15 minutes, les hématies sont séparées de la solution surnageante, elles occupent un volume V_1 ; elles sont remises en suspension dans $(5 - V_1)$ ml de solution de NaCl dont le Δ est compris entre -0,4 et - 1,5 ; six expériences sont ainsi réalisées ; les abaissements cryoscopiques sont respectivement égaux à : - 1,5; - 1,2; - 1; - 0,8; - 0,6; - 0,4°C. Après 3 minutes de contact et centrifugation dans les mêmes conditions, on note le nouveau volume globulaire : V_2 et on construit la courbe $V_2 = f(\Delta)$ (Fig.6a)
On représente sur le même graphique la courbe $V = f(\Delta)$ obtenue comme indiqué page 11 ; les deux courbes sont légèrement décalées.

B) L'expérience ci-dessus est reprise en préparant les hématies par immersion initiale dans une solution moins hypertonique que précédemment ($\Delta = - 1°C$), puis remises en suspension dans des solutions dont les abaissements cryoscopiques sont respectivement : - 1,5 - 1,2; - 0,8; - 0,6; - 0,4°C et on construit à nouveau la courbe $V'_2 = f(\Delta)$. (Fig.6b)

C) Enfin la même expérience est refaite avec des hématies initialement mises en suspension dans une solution encore moins hypertonique ($\Delta = - 0,8°C$) et on construit encore la courbe $V''_2 = f(\Delta)$ (Fig. 6c)

Discussion

a) Cette dernière courbe est pratiquement confondue avec ce que nous appellerons la courbe directe $V = f(\Delta)$ obtenue avec des hématies n'ayant pas subi de préincubation.

b) Un léger décalage apparaît entre $V = f(\Delta)$ et $V'_2 = f(\Delta)$; le décalage est plus net entre $V = f(\Delta)$ et $V_2 = f(\Delta)$.
Ce fait est explicable car lorsque les hématies sont mises en suspension dans la solution extérieure ($\Delta = - 1,5$) la contraction de volume entraîne une sortie d'eau (supposée être de l'eau pure) d'où une dilution de la solution extérieure dont l'abaissement cryoscopique à l'équilibre est de l'ordre de $\Delta = - 1,25$, qui est en même temps la valeur du Δ intra-globulaire.
Lorsque ces hématies sont remises en suspension dans une solution extérieure ($\Delta = - 1,5$) il y a une légère contraction d'où un point représentatif abaissé par rapport au point de la courbe directe, puisque les volumes sont portés en fonction de l'abaissement cryoscopique initial des solutions de remplacement.

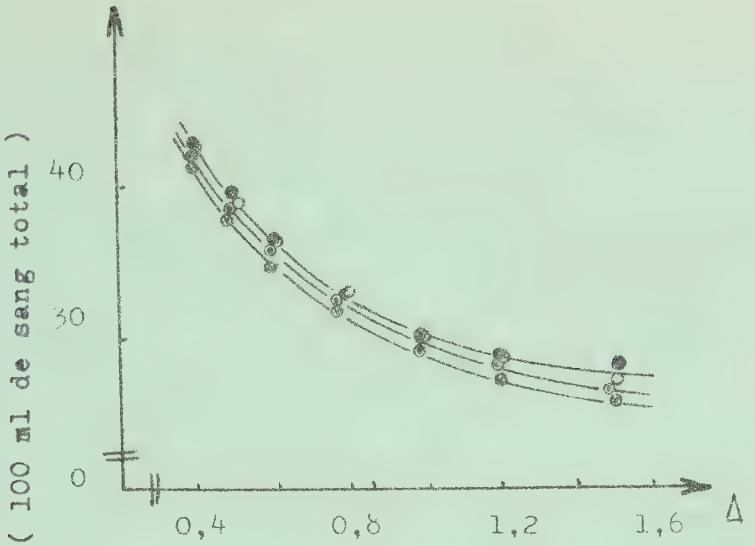


Figure 6

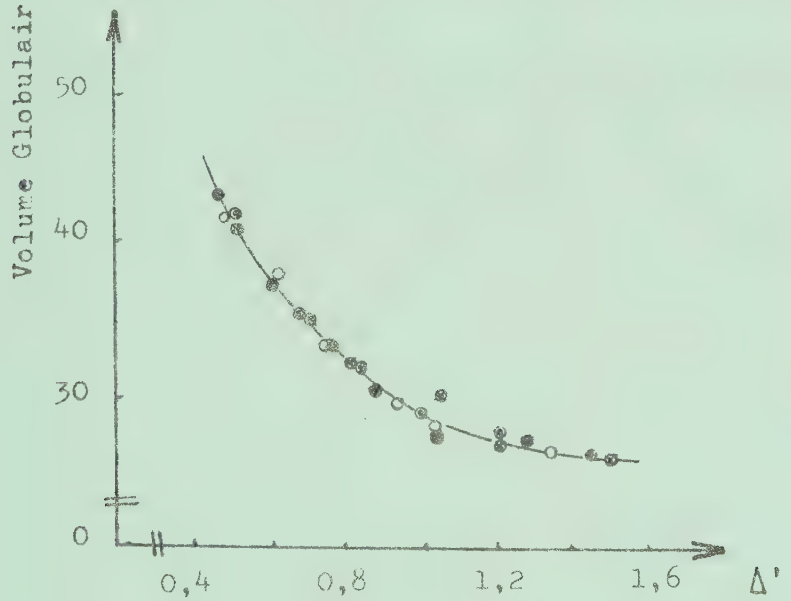


Figure 7

Variations du volume globulaire en fonction de la tonicité du milieu exterieur, exprimée par l'abaissement cryoscopique au temps zéro (Δ), figure 6 ; ou par cet abaissement une fois l'équilibre réalisé (Δ') figure 7.

- ● Globules témoins
- ○ Globules ayant séjournés dans un milieu hypertonique: $\Delta = -0,8$
- ● Globules ayant séjournés dans un milieu hypertonique: $\Delta = -1$
- ⊗ Globules ayant séjournés dans un milieu hypertonique: $\Delta = -1,5$

La même explication rend compte du décalage à peu près constant observé tout le long des deux courbes. On conçoit de même que le décalage soit plus faible lorsque les hématies initiales sont préparées avec des solutions moins hypertoniques.

Cependant, si on exprime les variations de V, V_2, V'_2, V''_2 en fonction non plus de l'abaissement cryoscopique initial (Δ) de la solution extraglobulaire mais de cet abaissement cryoscopique à l'équilibre (Δ') (x), il est possible de montrer (fig.7) que les courbes $V = f(\Delta')$, $V_2 = f(\Delta')$, $V'_2 = f(\Delta')$, $V''_2 = f(\Delta')$ sont confondues et donc qu'il y a réversibilité des phénomènes osmotiques.

IIème Série d'expériences -

Préparation d'hématies de tonicité variable remises en suspension dans leur plasma.

Le protocole expérimental est le même mais les solutions initiales dans lesquelles sont plongées les hématies ont des tonicités variables. Les hématies séparées de leur solution extérieure sont remises en suspension dans leur plasma.

Soit V_o le volume initial d'hématie normale.
On ajoute $(5 - V_o)$ ml de solution de NaCl de tonicité connue : la série d'expériences comporte les valeurs suivantes de l'abaissement cryoscopique : - 0,4; -0,6; - 0,8; - 1; - 1,2, - 1,5°C.
Après 3 minutes de contact et centrifugation 15 minutes à 4.800 g, on note le nouveau volume V_1. Selon les cas on observe :

$$V_1 > V_o$$
$$V_1 = V_o$$
$$V_1 < V_o$$

Les hématies sont alors remises en suspension dans :

- $(5 - V_1)$ ml de plasma si $V_1 \geqslant V_o$
- un mélange de :

$(5 - V_o)$ ml de plasma
$(V_o - V_1)$ ml d'eau
si $V_1 < V_o$

(x) Calcul de Δ' : Comme on le montre page 10, la courbe Δ = f (concentration) est une droite. Il suffit donc, pour connaître Δ', de calculer la concentration extérieure à l'équilibre en se basant sur les variations de volumes provoquées par les déplacements de solvant, et de déterminer graphiquement quel est l'abaissement cryoscopique correspondant (Δ').

Ce mélange est destiné à compenser la perte d'eau globulaire correspondant à l'abaissement de volume $(V_o - V_1)$.

Après 3 minutes de contact et centrifugation on mesure le nouveau volume V_2 représenté sur la fig.8.
Aux erreurs d'expériences près $(\pm 5$ p.100) : $V_2 \simeq V_o$

On peut donc conclure que le comportement osmotique des hématies dans les limites d'osmolarité utilisées $(-0,4 < \Delta < -1,5)$ est réversible ce qui justifie l'application de la loi de VAN T'HOFF.

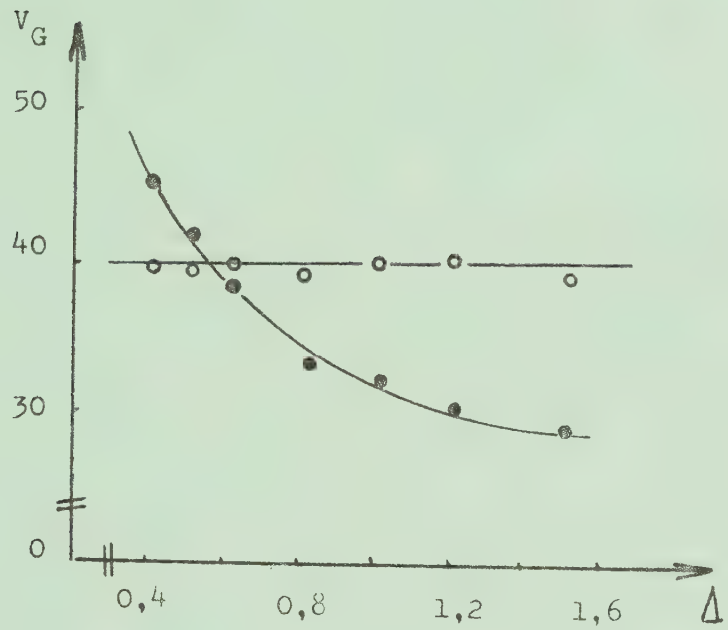


Figure 8 : Hématies de "tonicité variable" remises dans leur plasma (pour les détails se réferer au texte).

Variations du volume globulaire en fonction de la pression osmotique exterieure(exprimée en abaissement cryoscopique).

V - GENERALISATION DES RESULTATS PRECEDENTS

Osmométrie comparée dans des solutions de divers électrolytes

Si les résultats précédents ont une portée générale, c'est-à-dire s'il s'agit d'un phénomène strictement osmotique, on peut rechercher si des faits analogues peuvent être mis en évidence avec d'autres électrolytes.

Nous avons donc étudié le comportement d'hématies placées dans des solutions de divers électrolytes, utilisés à des concentrations osmotiquement équivalentes à celles utilisées avec NaCl.

Ces concentrations osmotiquement équivalentes sont déduites de la famille de courbes obtenues en traçant pour chaque électrolyte la courbe : abaissement cryoscopique - concentration. Ceci pour KCl, LiCl, NaBr, KBr, LiBr, $NaNO_3$, KNO_3, $LiNO_3$, K_2SO_4, Na_2SO_4, KPO_4H_2, $Mg(NO_3)_2$, $MgSO_4$, $NaCO_3H$, KCO_3H, $NaCH_3CO_2$, KCH_3CO_2.

La mise en suspension des hématies dans des solutions d'osmolarité définie de divers électrolytes et la lecture des variations du volume globulaire sont réalisées comme dans le cas de solutions de NaCl.

Quelques uns des résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant (Tableau V) où pour chaque électrolyte utilisé nous donnons le volume globulaire, rapporté à un volume de sang total de 100 ml, en fonction de la pression osmotique correspondante, exprimée en abaissement cryoscopique.

A partir du tableau précédent, on peut, pour chaque électrolyte, construire soit la courbe $V = f(p)$, soit $V = f(1/p)$ comme cela vient d'être fait avec le chlorure de sodium. On constate facilement que la représentation $V = f(1/p)$ est généralement linéaire avec une assez bonne approximation. Mais comme il était impossible de réaliser simultanément toutes ces expériences sur un même échantillon de sang, le volume globulaire initial mis en suspension (V_o) variait suivant la nature des différents échantillons (de 34 à 50 p.100). Il n'est donc pas possible de faire une étude comparée.

On peut alors adopter une représentation qui précisement élimine les fluctuations de V_o d'une expérience à l'autre ; il suffit de considérer les variations "relatives" du volume globulaire en fonction de l'osmoticité de la solution extérieure, en

TABLEAU 7

	V_o (x)	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,19	1,20	1,30	1,45	1,50
NaCl	48		50	47	43	40		38			37
KCl	37	44		36		30		29			28
LiCl	37	43	39	37	33	31		29			27
NaBr	48	54	52	47	44	42			40		
KBr	48	56	49	47	43	40		40			37
LiBr	34	39	36	32	30	29		28			26
$NaNO_3$	50		50		45			42			
KNO_3	43	47		42		38					33
$LiNO_3$	50	57	51		46	44		41			40
$Mg(NO_3)_2$	40	46		38	35	34		32			30
Na_2SO_4	48		45	43	40	37		36		35	
K_2SO_4	48	50	46	43	39	38	36				
$MgSO_4$	40	41	38	36	34						
KPO_4H_2	43	55	49	47	42	39		36			
$NaCO_3H$	42	44		39	35	34		33			32
KCO_3H	42	44		38	36	34		33			32
$NaCH_3CO_2$	42	46		40	38	35		34			
KCH_3CO_2	42	49		40	36	34		32			

(x) V_o : Volume globulaire initial pour 100 ml de sang total.

rapportant ces variations à un volume initial de globule :
V_o = 100 ml donc :

$$\frac{V - V_o}{V_o} \times 100 = f\left(\frac{1}{p}\right) \qquad (5)$$

où V_o est le volume globulaire initial
et V^o le volume correspondant à une pression osmotique p.

Nous constatons ainsi que les divers électrolytes étudiés correspondent à une famille de droites définies par la relation générale :

$$\frac{V - V_o}{V_o} \times 10^2 = \frac{a'}{p} - b' \qquad (6) \quad \text{(Fig.9)}$$

Avant d'indiquer la signification des droites obtenues, indiquons d'abord la signification des paramètres a' et b' par rapport aux paramètres a et b définis antérieurement.

L'équation précédente peut s'écrire :

$$V = \frac{a' V_o}{p} 10^{-2} + V_o (1 - b' 10^{-2}) \qquad (7)$$

d'où on déduit, par comparaison avec la relation (2) (p.11) :

$$a = a' V_o 10^{-2} \quad \text{d'où} \quad a' = \frac{a}{V_o} \cdot 10^2$$

$$b = V_o (1 - b' 10^{-2}) \quad \text{d'où} \quad b' = \frac{V_o - b}{V_o} \cdot 10^2$$

1) a' définit la pente de chaque droite compte tenu du volume initial.

2) l'expression $V_o (1 - b' \cdot 10^{-2})$ représente la valeur du volume globulaire pour une pression osmotique théoriquement infinie. Mais $V_o (1 - b' \cdot 10^{-2}) = V_o - V_o b' 10^{-2}$ c'est-à-dire le volume initial diminué d'une certaine partie de ce volume ($b' V_o 10^{-2}$) qui représente par conséquent la valeur maximum du volume d'eau transférable. Le coefficient $b' 10^{-2}$ (qui est < 1) a ainsi la signification suivante : il représente le nombre par lequel il faut multiplier le volume initial V_o pour connaître la partie de ce volume qui est osmotiquement transférable.

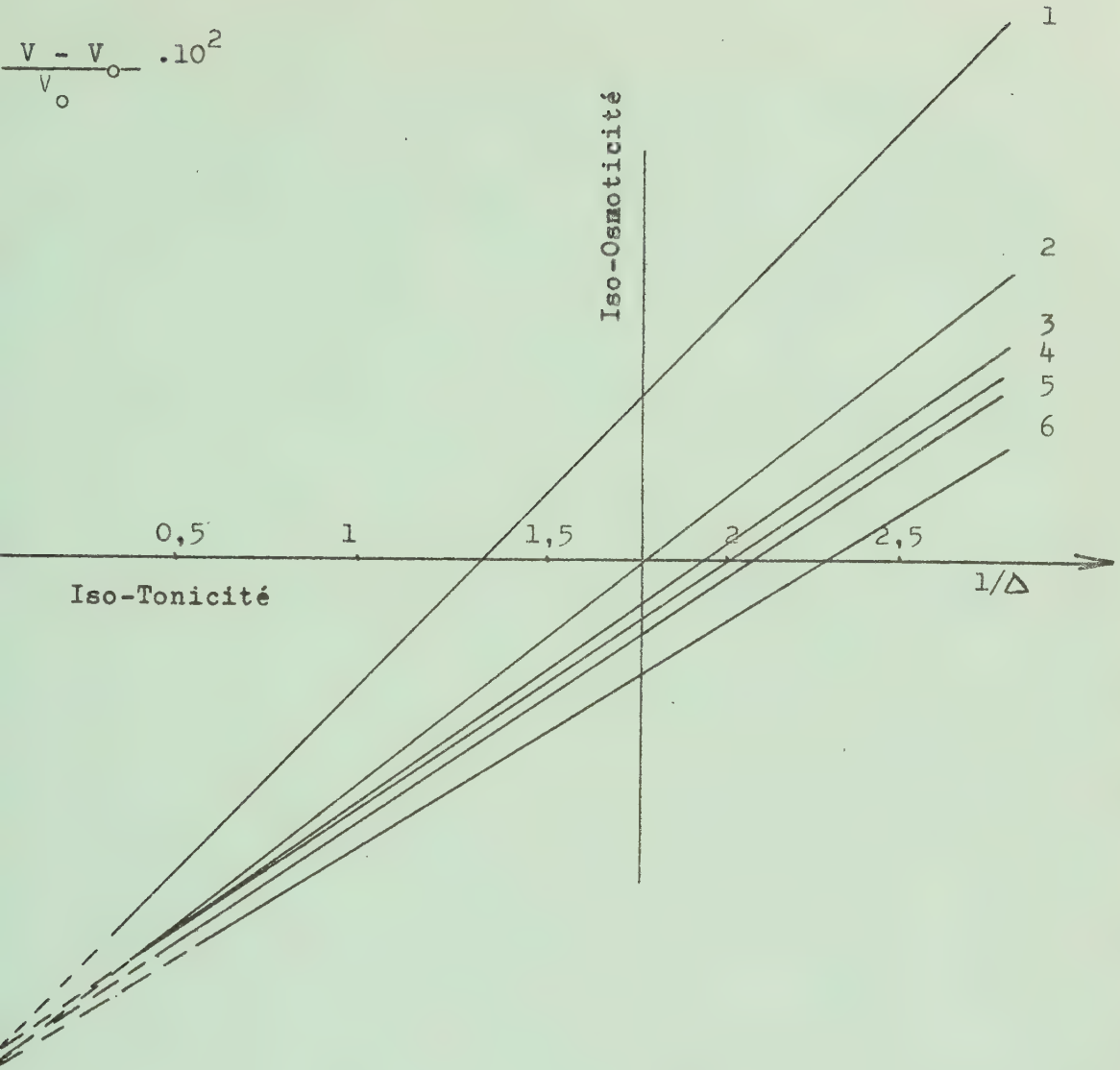


Figure 9 :Variation relative du volume globulaire en fonction de l'inverse de la pression osmatique exterieure (exprimée en abaisse - ment cryoscopique) pour toute une série d'électrolytes.

Afin de ne pas surcharger la figure ces varia - tions sont représentées par les droites obtenues en appliquant la méthode des"moindres carrés" aux points experimentaux.

1 KPO_4H_2

2 NaCl, KCl, LiCl
NaBr, KBr, LiBr

3 $NaCH_3CO_2$, KCH_3CO_2

4 $NaNO_3$, KNO_3, $Mg(NO_3)_2$.

5 $NaCO_3H$, KCO_3H.

6 Na_2SO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$.

Discussion des résultats précédents

1°) On constate que :

- les courbes osmométriques des trois chlorures sont pratiquement confondues et confondues avec les courbes osmométriques des bromures (les coefficients a' et b' demeurent inchangés quelque soit le cation associé aux anions chlorures ou bromures).
- Les courbes osmométriques des quatre nitrates sont pratiquement confondues.
- On observe la même chose pour les courbes osmométriques des deux bicarbonates;
- Les courbes osmométriques des deux acétates.
- Les courbes osmométriques des trois sulfates.

La pente moyenne et la valeur moyenne de l'ordonnée à l'origine calculées pour chaque électrolyte à partir des résultats expérimentaux sont en effet :

TABLEAU VI

Nature de l'électrolyte	a'	b'
KPO_4H_2	25,4	-35
NaCl, KCl, LiCl	20; 19,5; 19	-36,1 -36,4 -36
NaBr, KBr, LiBr	18, 21, 20	-35 -35,7 -36,5
$NaCH_3CO_2$, KCH_3CO_2	17, 17	-33 -34
$NaNO_3$, KNO_3, $LiNO_3$, $Mg(NO_3)_2$	16, 18, 17, 18	-35 -36 -34 [illegible]
$NaCO_3H$, KCO_3H	17, 17	[illegible] -35
Na_2SO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$	16, 17, 15	-37 -36,8 -36,4

On en déduit que dans l'équation (6) b' est sensiblement constant et a' varie pour chaque anion tout en restant indépendant de la nature du cation.

2°) Les droites représentatives de la relation $\frac{\Delta V}{V_o} = f(1/p)$ sont concourantes (avec une assez bonne approximation, le point de concours étant situé sur l'axe des ordonnées). Si on applique, en effet, la méthode "des moindres carrés" au tracé des différentes droites donnant la variation relative du volume globulaire en fonction de l'inverse de la pression osmotique extérieure, ceci pour chaque groupe d'électrolyte utilisé, on obtient les valeurs suivantes des coefficients a' et b' de l'équation (6) (comparés à ceux obtenus en faisant la moyenne des valeurs du tableau VI).

TABLEAU VII

Nature de l'électrolyte	a'		b'	
	méthode "moindres carrés"	moyenne tableau VI	"moindres carrés"	moyenne tableau VI
KPO_4H_2	25,4	25,4	-34,4	-35
NaCl, KCl, LiCl NaBr, KBr, LiBr	19,7	19,6	-35,5	-36,1
$NaCH_3CO_2$, KCH_3CO_2	17,2	17	-34	-33,5
$NaNO_3$, KNO_3, $LiNO_3$, $Mg(NO_3)_2$	17,1	17	-34,2	-35,4
$NaCO_3H$, KCO_3H	17,1	17	-35,6	-35,5
Na_2SO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$	16	16	-36,3	-36,7

Les droites ainsi définies (Fig.9) ont bien une ordonnée à l'origine sensiblement identique.

C'est dire que pour une pression osmotique théoriquement infinie ($1/p = 0$), en fait, suffisamment élevée, la contraction globulaire est la même quel que soit l'électrolyte utilisé. La valeur du volume globulaire est alors (équation 7) :

$$V \longrightarrow V_o\ (1 - b'10^{-2})$$

$b'10^{-2}$ est constant, sa valeur moyenne est $-0,35 \pm 0,007$ (écart standard). De sorte que la valeur minima que peut prendre le volume globulaire, pratiquement la même dans tous les cas est :

$$V \longrightarrow V_o\ (1 - 0,35) = 0,65\ V_o$$

Le volume maximum d'eau transférable est donc environ 35 p.100 du volume globulaire total soit environ 50 p.100 de l'eau totale globulaire et cela, quel que soit l'électrolyte utilisé.

La conclusion à tirer de cette première impression est que l'hématie a un comportement osmométrique qui, pour les valeurs élevées de la pression osmotique extérieure, est indépendante de l'électrolyte utilisé, ce qui permet de penser que la fraction d'eau non transférable est alors constante. Nous discutons plus loin de ces résultats.

3°) La figure 9 montre que, pour les électrolytes correspondant à la droite 2 (NaCl, KCl, LiCl, NaBr, KBr, LiBr) l'iso-osmoticité ($\Delta = -0,55$; $1/\Delta = -1,80$) correspond rigoureusement à l'isotonicité (aucune modification du volume cellulaire). Par contre, pour toutes les autres droites ceci n'est plus exact. On remarque que l'absence de modification de volume des hématies c'est-à-dire l'isotonicité (au sens rigoureux du mot) est obtenue pour des valeurs de pression osmotique différente, donc avec des solutions qui ne sont pas iso-osmotiques.
C'est ainsi que les valeurs des abaissements cryoscopiques correspondant à l'isotonie et montrant que des solutions iso-osmotiques ($\Delta = -0,55$) ne sont pas nécessairement isotoniques, sont les suivantes pour les électrolytes étudiés :

Electrolytes	Valeur de l'abaissement cryoscopique correspondant à l'isotonie exprimée en :	
	$1/\Delta$	Δ
KPO_4H_2	1,35	0,74
NaCl, KCl, LiCl, NaBr, KBr, LiBr	1,80	0,55
$NaCH_3CO_2$, KCH_3CO_2	1,97	0,50
$NaNO_3$, KNO_3, $LiNO_3$, $Mg(NO_3)$	2	0,50
$NaCO_3H$, KCO_3H	2,08	0,48
Na_2SO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$	2,27	0,44

Il semble donc que ce n'est que pour les chlorures et bromures précédemment indiqués que l'hématie se comporte comme un osmomètre, ce qui est attesté par la représentation linéaire

$$\frac{\Delta V}{V_o} = f\left(\frac{1}{\Delta}\right)$$

Quant aux autres électrolytes correspondant aux droites 1, 3, 4, 5, 6 de la figure 9, leur effet sur le volume des hématies est le même que celui des chlorures uniquement pour une pression osmotique théoriquement infinie.

Il résulte donc de ces faits que ce n'est qu'aux pressions osmotiques très élevées que le comportement osmotique de

l'hématie est prépondérant quelque soit l'électrolyte en cause. Dans ces conditions, en effet, le transfert de solvant a une importance telle qu'il masque tout autre phénomène.

On est ainsi conduit à préciser les limites du comportement osmotique des hématies.

L'étude de la résistance à l'hémolyse va nous apporter quelques données complémentaires.

VI - LIMITES DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES HEMATIES

Il résulte donc des faits précédents que, lorsque la pression osmotique extérieure est très élevée, l'hématie - ou du moins son volume osmotiquement utilisable - peut être assimilée à un osmomètre parfait (application de la loi de VAN-T'HOFF et réversibilité satisfaisante du phénomène).

Par contre, au voisinage de l'iso-osmolarité, des solutions de divers électrolytes ne produisent pas les mêmes effets sur le volume globulaire.

L'expérimentation décrite dans ce chapitre a pour but de préciser ces faits d'abord par l'étude de la résistance à l'hémolyse. Nous verrons ensuite comment la cinétique de la variation du volume globulaire apporte des précisions complémentaires.

A. Résistance à l'hémolyse d'hématies placées dans des solutions osmotiquement équivalentes de divers électrolytes.

1) Protocole expérimental

Pour obtenir l'hémolyse dite physico-chimique il suffit de placer les hématies dans une solution suffisamment hypotonique. L'éclatement des globules est instantané et intéresse la totalité de la suspension si on a affaire à de l'eau pure.

Mais si l'hypotonie est discrète, d'une part l'hémolyse n'est pas instantanée, et surtout elle n'intéresse pas également tous les globules. Il est alors possible, dans ce cas, de représenter le phénomène par une "courbe d'hémolyse" que l'on construit en portant en abscisse la concentration moléculaire de la solution extraglobulaire (exprimée en abaissement cryoscopique) et en ordonnée le pourcentage d'hémolyse obtenu.

Si l'hémolyse est due uniquement à un transfert d'eau, c'est-à-dire si elle est explicable par un phénomène purement osmotique, il n'y a aucune raison pour que les courbes obtenues avec des solutions de divers électrolytes d'une osmolarité équivalente, ne soient pas superposables.

On opère de la façon suivante : les hématies recueillies après centrifugation sont débarrassées de leur sérum interglobulaire par lavage avec une solution iso-osmotique (Δ = - 0,56) de l'électrolyte choisi (NaCl 8,8 p.1000 ; KCl 11,2 p.1000 ; $NaNO_3$ 13,6 p.1000 ; Na_2SO_4 17 p.1000 ; K_2SO_4 21,4 p.1000), puis mis en suspension dans ces mêmes solutions (10 vol. d'hématies

pour 100 de suspension). La mesure de la résistance globulaire est effectuée en mélangeant 0,3 ml de suspension aussi homogène que possible, et 10 ml de solution hypotonique d'osmolarité variable. On homogénéise. Après une heure de contact, on centrifuge et dose l'hémoglobine de la solution surnageante par photocolorimétrie (λ = 500 mμ). Les résultats sont exprimés en p.100 d'hémolyse totale provoquée par de l'eau pure (10 ml).

2) Résultats

Voici les résultats obtenus en étudiant la résistance globulaire du même échantillon de sang en présence de solutions hypotoniques de NaCl, KCl, Na_2SO_4, K_2SO_4.

TABLEAU VIII

NaCl		KCl	
Δ	p.100 d'hémolyse	Δ	p.100 d'hémolyse
0	100	0	100
0,36	100	0,36	95
0,38	100	0,38	93
0,39	94	0,40	85
0,41	77	0,42	65
0,43	48	0,43	68
0,44	24	0,44	37
0,46	38	0,45	40
0,47	22	0,46	25
0,48	6	0,47	9
		0,48	14
		0,49	5
Na_2SO_4		K_2SO_4	
0,26	91	0,26	100
0,27	90	0,28	88
0,28	73	0,29	78
0,29	46	0,30	56
0,30	62	0,31	44
0,31	25	0,32	41
0,31	26	0,33	22
0,32	14	0,34	10
0,33	21	0,36	5
0,34	4	0,39	2
		0,42	2

Comme le montre la figure 10 les courbes d'hémolyse correspondant aux solutions de NaCl et KCl sont pratiquement confondues, comme étaient confondues les courbes osmométriques. Il en est de même des courbes obtenues avec les solutions Na_2SO_4 et K_2SO_4. Par contre, la courbe d'hémolyse "Chlorure" et la courbe d'hémolyse "sulfate" sont nettement décalées. (x)

Ce décalage montre d'abord que les solutions de sulfate de sodium ou de potassium sont moins hémolysantes que les solutions de chlorures. Ainsi un abaissement cryoscopique de - 0,4°C réalisé avec NaCl ou KCl entraîne de 90 à 100 p.100 d'hémolyse alors qu'il ne produit qu'une hémolyse négligeable s'il s'agit de solutions de Na_2SO_4 ou K_2SO_4. Tout se passe donc comme si la pénétration d'eau dans les globules (imposée par l'hypotonie de la solution extérieure) était moins importante avec les sulfates qu'avec les chlorures.

Nous retrouvons donc, par la mesure de la résistance globulaire, ce que nous avons montré antérieurement, à savoir, que des solutions de divers électrolytes iso-osmotiques n'ont pas forcément la même tonicité vis-à-vis des hématies. Les solutions de sulfates sont moins hypotoniques que les solutions osmotiquement équivalentes de chlorures.

B. Cinétique du comportement osmotique des hématies

L'expérimentation qui suit est destinée à préciser les faits précédents qui, nous venons de le voir, comportent une contradiction que l'on peut schématiser de la façon suivante :

- Lorsque la pression osmotique extérieure est très élevée, l'hématie (ou du moins son volume osmotiquement utilisable) se comporte comme un osmomètre parfait.

- Cet osmomètre devient de moins en moins parfait au fur et à mesure que l'osmolarité diminue.

Or, le souvenir de DUTROCHET et de son expérience fondamentale suggère une méthode permettant de confirmer les faits précédents. En voici le principe :

Soit V_0 le volume globulaire initial (les hématies étant dans leur plasma). Lorsque ces hématies sont placées dans une solution d'osmolarité plus élevée, le volume diminue ; l'expérience consiste à suivre les variations de ce volume en fonction

---

(x) Nous avons réalisé ces expériences sur d'autres groupes d'électrolytes : $NaNO_3$, KNO_3, et K_2SO_4 - $NaNO_3$ - NaCl. Les résultats montrent que les courbes d'hémolyse des deux nitrates sont approximativement superposées et que la courbe "nitrate" s'intercale entre la courbe "sulfate" et la courbe "Chlorure".

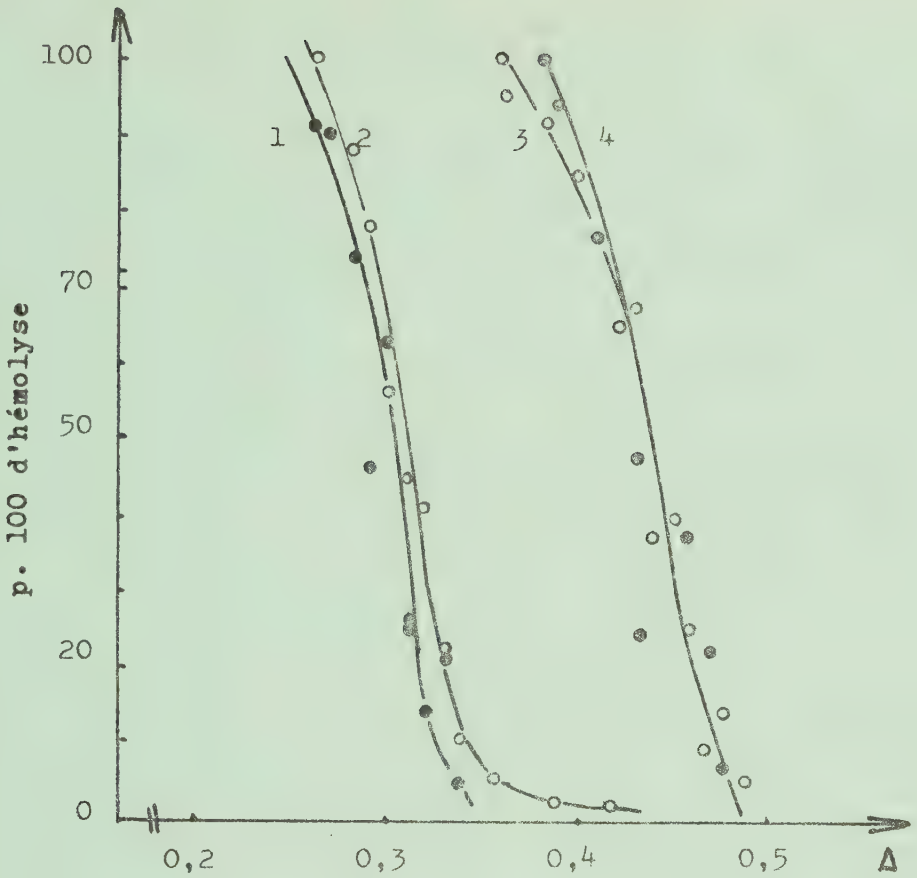


Figure 10 :Courbes d'hémolyse d'hématies dans diverses solutions d'électrolytes.

- Abscisses : Pression osmotique extra-globulaire (exprimée en abaissement cryoscopique)
- Ordonnées : p.100 d'hémolyse par rapport à l'hémolyse totale.

(1) Solution exterieure : Na_2SO_4
(2) Solution exterieure : K_2SO_4
(3) Solution exterieure : KCl
(4) Solution exterieure : NaCl

On remarquera le décalage des courbes "Clorures" et des courbes "Sulfates".On note également l'indifférence du cation.

du temps.

Deux cas sont à distinguer :

1°) Le soluté ne peut pénétrer dans les hématies : le rétablissement de l'équilibre n'est possible que par sortie d'eau globulaire d'où diminution de volume.
Soit V_m la valeur la plus faible observée ; si le phénomène osmotique est seul à intervenir, ce volume doit rester constant, quelle que soit la durée du contact.

2°) Si le soluté peut diffuser vers les globules, la contraction globulaire doit diminuer avec le temps et le volume final tendre vers le volume initial.

Avant de présenter les résultats obtenus dans cet ordre d'idées, il convient de préciser la notion de volume minimum globulaire observé, dans les conditions expérimentales utilisées, c'est-à-dire avec la méthode à l'hématocrite.

Note sur le volume minimum observé.

SIDEL et SOLOMON (51) ont montré, au moyen d'une méthode optique, que l'établissement de l'équilibre osmotique des hématies placées dans des solutions anisotoniques est très rapide (de 1 à quelques secondes).
L'enregistrement graphique du phénomène montre que le volume globulaire diminue (ou augmente) selon que la solution extérieure est hyper ou hypotonique puis reste constante à l'échelle de temps de leurs observations (quelques secondes).

Or, nous avons montré (p.10) en utilisant la méthode beaucoup moins fine, de l'hématocrite que, lorsque l'osmolarité extérieure est comprise entre Δ = - 0,5 et Δ = - 1,2 la contraction globulaire observée reste pratiquement constante durant 3 heures environ. Ainsi, la valeur (constante) du volume globulaire obtenue après quelques secondes par SIDEL et SOLOMON est-elle la même que celle (constante également) que nous observons au plus tôt après l'inévitable durée de la centrifugation (15 minutes environ).

Ainsi, lorsque les hématies sont placées dans des solutions hypertoniques peu ou pas diffusibles (NaCl par exemple), on peut admettre que le volume minimum observé après 1 à 3 heures de contact n'est pas sensiblement différent du minimum observable par des techniques permettant la mesure après quelques secondes de contact.

Par contre, cela n'est plus acceptable si le soluté est facilement diffusible.

Cinétique de la variation de volume globulaire dans une solution de NaCl d'osmolarité = 0,8 osM (Δ = - 1,5)

Voici les données numériques (Tableau IX) et le graphique correspondant (Fig.11, courbe I)

TABLEAU IX

Temps de contact	Volume en ml (x)		
	V_o	V_1	$\frac{(V_o - V_1) \times 10^2}{V_o}$
1 min	2,5	1,80	- 28
8 "	2,5	1,80	- 28
17 "	2,5	1,80	- 28
30 "	2,5	1,80	- 28
1 heure	2,5	1,83	- 26,8
1 h 40	2,5	1,85	- 26,25
4 h 30	2,5	1,86	- 25,50
8 h	2,5	1,97	- 24
15 h	2,5	1,90	- 24,5

Conformément à ce qui vient d'être dit, nous admettons que la variation relative de volume observé après 1, 8, 17 et 30 minutes restant constante représente la valeur minima observable, donc correspond au phénomène osmotique, puis la légère augmentation de volume qui se produit et se stabilise vers 24 heures correspond à la légère diffusion globulo-plasmatique du soluté.

Voici maintenant la même expérience reproduite avec des solutions de glycérol.

Cinétique de la variation du volume globulaire dans une solution de glycérol et de NaCl.

Il n'est pas possible d'opérer avec des solutions pures

(x) V_o = Volume initial

V_1 = Volume globulaire observé après temps de contact (variable) des hématies et de la solution extérieure.

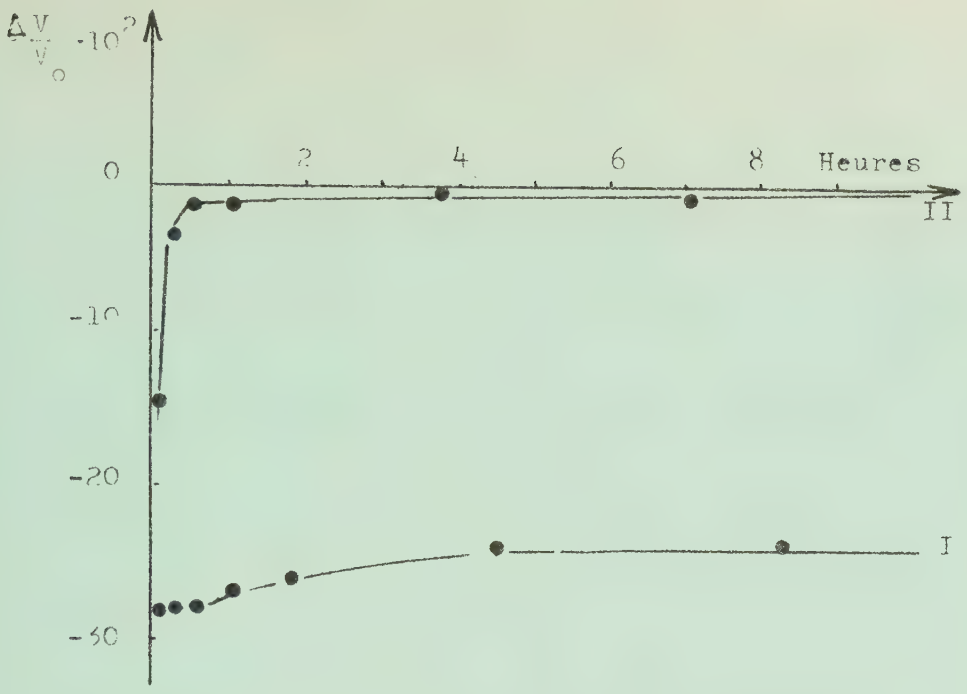


Figure 11: Cinétique de la contraction des hématies dans des solutions hyperosmotiques ($\Delta = -1,5$)

I Solution de NaCl

II Solution de Glycérol

On a représenté les variations de volume relatives afin de rendre les expériences comparables.

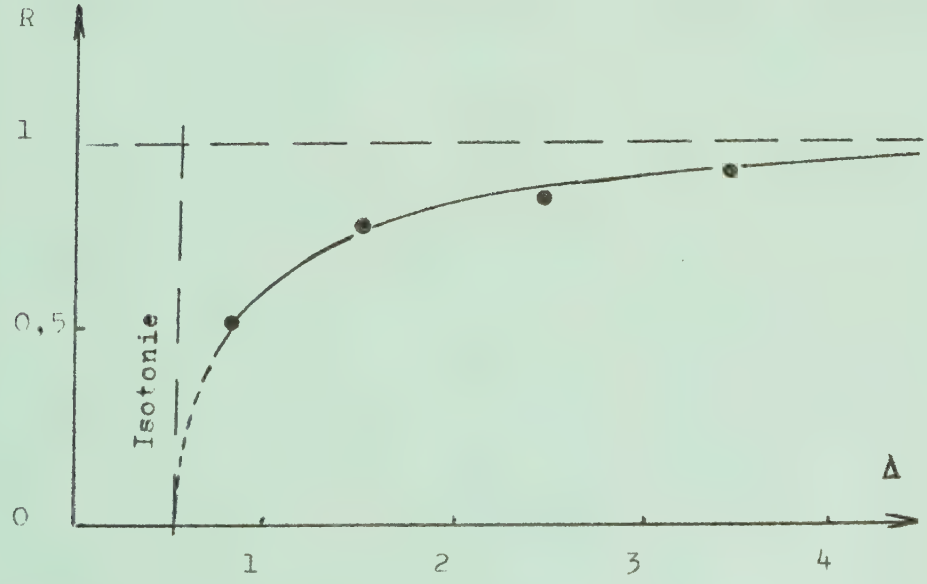


Figure 12 : Variations du rapport, $R = \frac{V_o - V_f}{V_o - V_m}$, en fonction de la pression osmotique exterieure (exprimée en Δ).

de glycérol car l'hémolyse est instantanée.

En effet, le glycérol comme l'urée, en solution iso-osmotique, hémolyse instantanément les globules rouges (GRIJNS, 1896, (52) (x)) ce que l'on explique par la diffusion de ces non-électrolytes dont la vitesse de pénétration dans les globules est supérieure à celle de l'eau (HARRIS (39)).

Comme AMSDEN (54) le signale, l'osmolarité d'une solution baignant les globules rouges, est déterminée par la concentration totale des molécules du soluté alors que la tonicité de la même solution est déterminée par la concentration des molécules du soluté qui ne traversent pas la membrane des hématies.

Dans ces conditions, des solutions iso-osmotiques de glycérol ou d'urée se comportent comme de l'eau pure et sont hypotoniques vis à vis des hématies.

Nous avons donc, comme milieu extra-globulaire, utilisé un mélange de

glycérol = 0,5 osM/l
NaCl = 0,3 osM/l

L'osmolarité totale est par conséquent la même que dans l'expérience précédente mais nous devrions obtenir à l'équilibre aucune variation de volume globulaire puisqu'un tel mélange doit se comporter comme une solution isotonique.

Les résultats sont ceux du Tableau X et représentés sur la figure 11, courbe II.

La diminution de volume est nettement plus faible que dans le cas précédent et tend très rapidement à disparaître.

TABLEAU X

Temps de contact	Volume (en ml)		
	V_o	V_1	$\frac{(V_o - V_1)\ 10^2}{V_o}$
1 minute	2,19	1,87	- 14,5
15 "	2,18	2,10	- 3,6
30 "	2,19	2,16	- 1,3
55 "	2,16	2,13	- 1,5
3 h 45	2,16	2,15	- 0,45
7 h	2,18	2,15	- 1,3
12 h 30	2,20	2,19	- 0,45
23 h	2,16	2,17	+ 0,45

V_o et V_1 même signification que pour le tableau IX.

(x) cité par HOBER (53)

Essai d'évaluation quantitative de l'importance des phénomènes osmotiques.

Il s'agit d'hématies en solution hypertonique désignées par :

V_o = volume globulaire initial

V_m = volume globulaire minimum observé

V_f = volume globulaire à l'équilibre (volume final)

On a dans tous les cas :

$$V_o > V_m$$
$$V_m \leqslant V_f$$

Si $V_m = V_f$ (cas idéal) le phénomène osmotique est pur.

Si $V_m < V_f$ le transfert de solvant s'accompagne de transfert, en sens inverse, du soluté et à long terme d'autres processus que la simple diffusion.

Si l'on admet que la contraction globulaire initiale ($V_o - V_m$) est due à une brusque sortie d'eau, la contraction (moins importante) observée à l'équilibre ($V_o - V_f$) résulte de la superposition de deux faits : phénomène osmotique initial et pénétration d'une faible partie de soluté extra-globulaire diminuant de ce fait la sortie d'eau des globules.
Au total, la part prise par le phénomène purement osmotique dans le résultat final apparaît d'autant plus importante que le rapport $\frac{V_o - V_f}{V_o - V_m}$ est plus près de 1.

On peut alors admettre schématiquement les propositions suivantes, une fois l'équilibre réalisé :

1°) $\frac{V_o - V_f}{V_o - V_m} = 1$: Phénomène osmotique pur

2°) $0 < \frac{V_o - V_f}{V_o - V_m} < 1$: Phénomène partiellement osmotique compliqué de diffusion

Le calcul de ce rapport fournit les résultats suivants pour les deux expériences indiquées :

a) Solution extérieure formée de NaCl (0,8 osM/l)

$$\frac{V_o - V_f}{V_o - V_m} = 0{,}785$$

b) Solution extérieure formée de 0,3 osM/l NaCl et 0,5 osM/l glycérol

$$\frac{V_o - V_f}{V_o - V_m} = 0$$

Ainsi, dans ce cas, une fois l'équilibre réalisé, environ 12 à 13 heures après le début de l'expérience, pas de modification de volume, la participation osmotique est nulle ; seule intervient l'égale répartition du soluté diffusible, comme on pouvait l'attendre des travaux cités page 33 .

Par contre, dans le cas de NaCl, le volume globulaire final est peu différent du volume minimum et reste donc très différent du volume initial.

A partir des données précédentes, on peut envisager d'étudier la valeur du rapport

$$R = \frac{V_o - V_f}{V_o - V_m}$$

en fonction de la pression osmotique extérieure utilisée. Car, étant donné les résultats déjà indiqués (inégalité de comportement osmotique pour les osmolarités élevées et pour les osmolarités faibles) il est intéressant de chercher à les vérifier.

La figure 12 ci-après groupe quelques données numériques obtenues avec des solutions de NaCl.

On constate ainsi que le rapport

$$R = \frac{V_o - V_f}{V_o - V_m}$$

tend vers 1 lorsque la pression osmotique s'élève, ce qui laisse penser que le phénomène osmotique n'est véritablement prépondérant, au point de masquer tout autre mécanisme, que pour de très fortes osmolarités.

VII - CONSEQUENCES GENERALES DE L'ETUDE DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES HEMATIES

De l'ensemble des résultats obtenus au cours de l'étude précédente résulte la nécessité de distinguer deux notions trop souvent confondues : iso-tonicité et iso-osmoticité.

1°) Une solution est iso-osmotique par rapport au milieu intérieur cellulaire si milieu intérieur et milieu extérieur développent la même pression osmotique, c'est-à-dire ont même osmolarité que l'on mesure par l'abaissement cryoscopique de la solution. C'est ainsi qu'une solution d'un composé quelconque dont l'abaissement cryoscopique est de l'ordre de - 0,56°C est pratiquement iso-osmotique par rapport aux hématies. Il n'en résulte pas que les hématies, dans cette solution, ne subiront aucun changement de volume. C'est ainsi que des solutions iso-osmotiques d'urée ou de glycérol entraînent l'hémolyse quasi-instantanée des hématies.

2°) Une solution iso-osmotique est, en outre, isotonique lorsque les hématies qui sont en suspension ne subissent aucun changement de volume ce qui suppose l'hémiperméabilité de la membrane.

3°) Si des hématies sont mises en suspension dans une solution hyper-osmotique par rapport au milieu intérieur de l'hématie, on doit distinguer deux cas :

a) La substance en solution est très diffusible (urée, glycérol, glycol...) : on obtient une hémolyse presque instantanée ce qui s'explique par une diffusion rapide du soluté, rendant la solution intra-globulaire fortement hypertonique par rapport au milieu extra-globulaire.

b) Si le soluté est peu ou non diffusible, il se produit rapidement une importante contraction globulaire qui se maintient dans le temps. On dira alors que la solution hyper-osmotique est, dès le début, hypertonique et elle reste hypertonique. De plus, si la solution extérieure est très fortement hyper-osmotique, la contraction globulaire est toujours la même quel que soit le soluté peu ou non diffusible utilisé.

Dans ces conditions, l'hématie peut être assimilée à un osmomètre parfait du moins pour la partie de son volume osmotiquement transférable (30 à 35 p.100 environ du volume globulaire total).

Enfin, les modifications de volume observées sont réversibles.

4°) Le comportement osmotique de l'hématie est très difficile à étudier avec des solutions de substances même peu diffusibles et ayant des osmolarités voisines de celle de l'hématie.

Dans ces conditions, en effet, la nature de la substance étudiée intervient car le discret phénomène de diffusion n'est plus masqué par un très gros déséquilibre osmotique.

Cet aspect est précisé dans les chapitres suivants.

- DEUXIEME PARTIE -

PHENOMENES DE DIFFUSION

I - INTRODUCTION

II - LE PROBLEME GENERAL DE LA DIFFUSION ET LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE

III - CONDITIONS D'ETUDE DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE AVEC ^{35}S

IV - CINETIQUE DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE DES SULFATES ALCALINS

V - EXPLOITATION DES RESULTATS. ROLE DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE INITIALE ET DU TEMPS DE CONTACT DANS LE PHENOMENE DE PENETRATION GLOBULAIRE. EVALUATIONS DES COEFFICIENTS DE TRANSFERT

VI - ETUDE DU RAPPORT DE DISTRIBUTION DE L'ION SO_4^{--} ENTRE GLOBULES ET PLASMA

VII - MECANISME DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE DES SULFATES ALCALINS

VIII - CONCLUSION

I - INTRODUCTION

L'ensemble des résultats obtenus dans les précédents chapitres nous a montré que les phénomènes osmotiques ne peuvent pratiquement pas se manifester isolément dans les échanges globulo-plasmatiques excepté dans des cas très particuliers (très forte hyper-osmolarité de la solution extra-globulaire et faible diffusibilité du corps dissous), et encore ne s'agit-il là que d'une très grande disproportion entre phénomène osmotique et phénomène de diffusion mais disproportion telle que les transferts ioniques sont alors pratiquement masqués par les transferts de solvant.

Dans les pages qui suivent on se placera dans des conditions aussi rigoureuses que possible d'iso-osmoticité de façon à rendre négligeables, sinon nuls, les phénomènes proprement osmotiques (au moins initiaux). Il est évident que dans ces conditions, le seul phénomène initialement possible, lorsque des hématies se trouveront dans une solution iso-osmotique d'un composé diffusible, sera un passage vers les globules, les mouvements éventuels de solvant n'en étant que la conséquence.

Bien entendu, et comme dans la première partie, les conditions expérimentales sont telles que les transferts "actifs" ne puissent être pris en considération (ce qui sera l'objet de la troisième partie).

Il suffit pour cela de ne pas ajouter de glucose, ce qui élimine le fonctionnement énergétique des hématies, d'utiliser du sang prélevé depuis un temps suffisant, et de travailler à une température de l'ordre de 20°C.

Nous apportons ci-dessous les résultats obtenus dans l'étude du passage, vers les hématies, d'ions SO_4^{--} contenus dans une solution extra-globulaire iso-osmotique (plasma ou solution de remplacement). L'expérimentation a été conduite de façon à mettre en évidence les deux facteurs suivants de la loi fondamentale de la diffusion.

1°) Rôle du temps dans l'évolution du phénomène
2°) Influence, sur la diffusion globulo-plasmatique, de la concentration de la substance dialysante

Nous montrons d'autre part que la pénétration d'ions $SO_4^{=}$ s'accompagne d'une sortie des ions Cl^-.

Quant au choix, pour cette étude, des ions SO_4^{--}, il se trouve justifié par les raisons suivantes :

1°) Des travaux déjà anciens de MAIZEL (1934) (55), de PARPART (1940) (56) ont montré que la pénétration globulaire des sulfates est possible. Plus récemment, SCHWEITZER et PASSOW (1955) (57) ont étudié les échanges Cl^-/SO_4^{--} dans les hématies.

2°) Enfin, nous disposons de SO_4^{--} marqué par ^{35}S d'où la possibilité d'études précises.

II - LE PROBLEME GENERAL DE LA DIFFUSION ET LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE

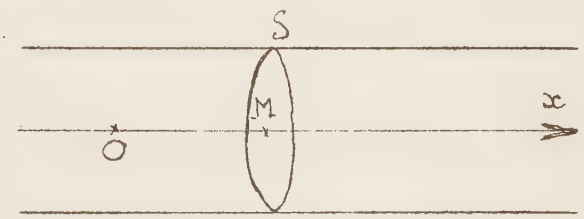
Les biologistes utilisent volontiers le terme de diffusion. Bien souvent ne peuvent être précisées les conditions du phénomène ce qui rend difficile la référence aux définitions fondamentales.

On sait que les définitions servant de base à l'étude de la diffusion résultent de l'hypothèse fondamentale de FICK (1855) selon laquelle "la diffusion d'un corps pur dans son solvant obéit à des lois de même nature que celles qui régissent la propagation de la chaleur dans un conducteur".

Si l'on considère alors dans les conditions les plus simples un corps diffusant selon une direction Ox à travers une section S perpendiculaire à cette direction, la quantité dq de substance qui traverse S pendant le temps dt est :

$$dq = - D S \frac{\partial c}{\partial x} \cdot dt$$

$\frac{\partial c}{\partial x}$ est le gradient de concentration en un point M de la section S ; D est le coefficient de diffusion ; il dépend de la nature du corps diffusible et du solvant, de la température ainsi que de la concentration de l'un dans l'autre. Le signe - signifie que la diffusion se fait en sens inverse du gradient.



La relation précédente n'est qu'un cas particulier d'ailleurs généralisable ; elle a pour nous l'intérêt majeur de montrer que tout phénomène de diffusion dépend finalement de trois facteurs :

- nature du composé diffusant
- concentration de la solution
- temps

Dès que l'on veut transposer les données précédentes à un système comportant une membrane, le coefficient de diffusion peut être remplacé par le terme coefficient de perméabilité dont la définition est assez empirique et qui, naturellement, dépend des caractères de la membrane.

Dans l'étude de la diffusion des ions sulfates, envisagée ici, le système est un système clos, formé de deux compartiments dont les volumes demeurent constants en fonction du temps mais dont les concentrations respectives vont évoluer jusqu'à ce qu'un certain état d'équilibre soit atteint. C'est dire donc que les phénomènes obéissent aux lois de la diffusion en "régime variable".

Les conditions expérimentales peuvent être définies de la façon suivante :

Soient deux compartiments 1 et 2.

P : la quantité totale de substance diffusible dans 1.
Au temps $t = 0$, $P = P_o$

Q : la quantité totale de substance diffusible dans 2.
On considèrera le cas où $Q = 0$ au temps $t = 0$

Il en résulte immédiatement :

$$P + Q = P_o \qquad (1)$$

On appellera k_1 le coefficient de transfert de 1 vers 2
k_2 " " " 2 vers 1

L'application à un tel système de la loi de diffusion permet d'écrire :

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 P - k_2 Q$$

c'est-à-dire, compte tenu de (1) :

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 P_o - (k_1 + k_2) Q$$

relation qui conduit, après intégration, à :

$$Q = \frac{k_1}{k_1 + k_2} P_o \left[1 - e^{-(k_1 + k_2) t}\right] \qquad (2)$$

ce qui montre que la quantité de substance diffusible passée au temps t de 1 vers 2 dépend du temps, de la concentration initiale dans le compartiment 1 et des coefficients k_1 et k_2.

La relation précédente prend une forme plus simple en introduisant la quantité de substance présente dans le compartiment 2 au bout d'un temps suffisamment long.

Si on fait $t \longrightarrow \infty$, $Q \longrightarrow \frac{k_1}{k_1 + k_2} P_o$ que l'on appellera Q_∞

L'équation (2) devient alors :

$$Q = Q_\infty \left[1 - e^{-(k_1 + k_2)\, t} \right] \qquad (3)$$

qui se prête aisément à une vérification expérimentale.

Le critère qui permet de vérifier si le système étudié est convenablement représenté par les formules qui précèdent (analogues à celles permettant de calculer les constantes de vitesse de 2 réactions "opposées") sera donc la constance des valeurs de k_1 et k_2.

III - CONDITIONS D'ETUDE DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE AVEC ^{35}S

L'utilisation de sulfate marqué dans l'étude des phénomènes de diffusion globulo-plasmatique des sulfates alcalins implique la possibilité de déterminer la radio-activité émise par ^{35}S dans trois cas :

1°) Plasma (milieu protéique, contenant $^{35}SO_4^=$ (x))

2°) Solutions iso-osmotiques ($\Delta = -0,56$) de Na_2SO_4 (17 p.1000) ou K_2SO_4 (21 p.1000) contenant $^{35}SO_4^=$, utilisées en remplacement du plasma.

3°) Globules ayant séjourné au contact de l'un des milieux précédents.

Pour doser les sulfates, une courbe d'étalonnage est construite à chaque série d'expériences, soit par dilutions appropriées de la solution radio-active initiale incorporée au plasma, soit par dilution des solutions iso-osmotiques (fig.13).

Dans chaque cas, (courbe d'étalonnage et dosages) on se place dans les mêmes conditions ; la radio-activité exprimée par le nombre de coups-minute est enregistrée au "Compteur Totalisateur MESCO" à partir d'un résidu sec contenu dans des capsules d'aluminium de diamètre déterminé, placées toujours à la même distance du compteur. Selon les cas, le diamètre était 25, 28 ou 30 mm.

Des essais préliminaires montrent que les résultats les plus reproductibles sont obtenus avec des prises d'essai telles que le nombre de coups-minute soit compris entre 200 et 1000 c/m pour des temps de comptage de l'ordre d'une dizaine de minutes pour chaque échantillon.

(x) Chaque fois qu'il sera question de $^{35}SO_4^=$ il s'agira d'une solution iso-osmotique de sulfate alcalin rendue fortement radio-active par de micro-quantité de soufre marqué (^{35}S)$_{\frac{N}{100}}$ se présentant sous forme d'acide sulfurique sensiblement

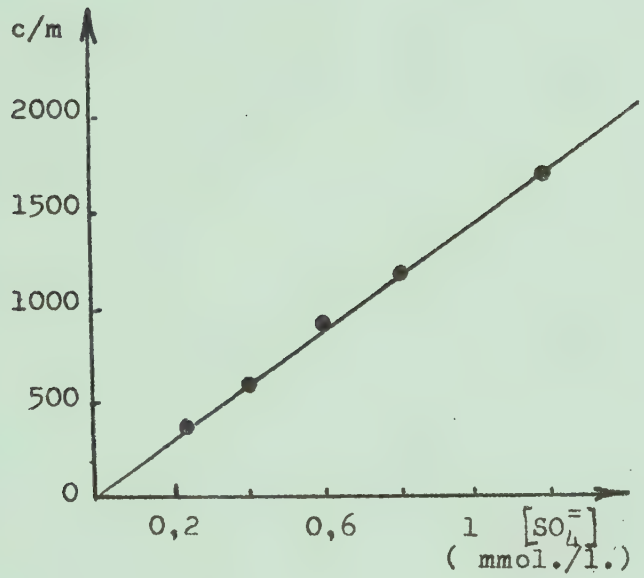


Figure 13 : Courbe "type" d'étalonnage.

Activité d'une solution radioactive (exprimée en coups par minute) en fonction de sa teneur en ions $SO_4^{=}$.

Etant donné d'autre part le faible pouvoir pénétrant des particules β émises par ^{35}S, on doit mesurer la radio-activité sur un résidu sec aussi peu abondant que possible. L'absorption d'une partie des radiations au sein du résidu est illustrée par l'exemple suivant qui consiste à mélanger 1 ml de solution radio-active de $^{35}SO_4^=$ avec :

a) 9 ml d'eau (Echantillon A)
b) 9 ml de solution iso-osmotique de K_2SO_4 (Echantillon B)
c) 9 ml de solution saturée de NaCl (Echantillon C)
d) 9 ml de plasma (Echantillon D)

On prélève 1 ml du mélange, évaporé à sec ; les résultats sont les suivants :

Echantillon A	4.100	coups/minute
Echantillon B	2.350	" "
Echantillon C	2.100	" "
Echantillon D	1.650	" "

ce qui montre que :

1) La radio-activité mesurée diminue avec l'abondance du résidu minéral (échantillon A, B et C).

2) L'absorption de radiations est plus importante encore avec un résidu protéique (échantillon D).

Il convient donc d'opérer sur des résidus pratiquement négligeables, c'est-à-dire de partir de solutions radio-actives assez concentrées pour présenter une radio-activité mesurable (200 à 500 c/m) après une dilution plus importante.

Nous avons envisagé d'isoler les sulfates par précipitation barytique de filtrat trichloracétique. Mais cette technique, qui est d'ailleurs assez laborieuse ne permet pas d'éviter un abondant résidu minéral lorsque les ions $^{35}SO_4^=$ sont mélangés à une solution iso-osmotique de sulfate alcalin. De sorte que les conditions les plus favorables sont obtenues avec de fortes dilutions et après calcination.

Compte tenu des remarques précédentes, nous avons utilisé des solutions radio-actives d'activité telle qu'après dilution à 1/200, le nombre de coups/minute enregistré soit compris entre 500 et 1000. (x)

Cette solution est utilisée pour incorporer $^{35}SO_4$ soit au plasma, soit à une solution iso-osmotique.

(x) L'erreur expérimentale moyenne est de l'ordre de 1 à 2 p.100 toujours supérieure à "l'erreur probable" liée aux fluctuations statistiques de l'émission des particules radio-actives qui dans les conditions de comptage utilisé (p.44) est comprise entre 0,8 et 1,5 p.100.

En résumé, la technique utilisée pour les trois cas mentionnés était la suivante :

1°) Plasma : On dose l'activité sur le résidu calciné de 1 ml de dilution de plasma au 1/50, au 1/100 ou au 1/200.

2°) Solution iso-osmotique de sulfate alcalin : même technique que pour le plasma.

3°) Globules : On dose l'activité sur une prise d'essai de 1 ml d'hémolysat globulaire au 1/50 après avoir évaporé à sec et calciné.

IV - CINETIQUE DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE DES SULFATES ALCALINS

I. Principe

A partir de sang de cheval, on sépare globules et plasma. Le plasma est additionné de $^{35}SO_4^=$ puis on reconstitue, compte tenu des conditions de volume, le sang initial.

L'expérience consiste à suivre, en fonction du temps, la baisse de radio-activité du plasma, qui traduit la pénétration globulaire des sulfates.

II. Protocole expérimental

1) Détermination du volume globulaire initial

Selon les expériences et les quantités de sang disponibles, nous avons fait ces mesures soit par un hématocrite banal (tube de 5 ml) soit par micro-hématocrite en tube capillaire permettant de travailler sur quelques μl de sang et donc de multiplier les déterminations. La lecture, réalisée avec une abaque, est correcte à 1 ou 2 p.100 près.

2) Préparation de plasma contenant $^{35}SO_4^=$

Au volume de plasma correspondant à 5 ml de sang (compris généralement entre 2,5 et 3 ml), on soustrait de 0,1 à 1 ml, que l'on remplace par le même volume de solution de Ringer-sulfate contenant $^{35}SO_4^=$.
En voici la composition :

Na_2SO_4		16,6	g
$CaCl_2$		0,24	g
$MgCl_2$		0,094	g
Na_2PO_4H		0,355	g
H_2O	qsp	1000	ml

L'abaissement crysocopique d'une telle solution est Δ = - 0,55°C, son pH est 7,42 et elle est tamponnée.
La radio-activité est telle qu'après dilution appropriée on obtienne entre 200 et 1000 coups/minute.

On peut ainsi, d'après le volume de plasma remplacé par du "Ringer-sulfate", faire varier la concentration de $SO_4^=$ dans le milieu extra-globulaire comme l'indique le tableau ci-dessous.

TABLEAU XI

Echantil. de sang	Vol.de solution de Ringer-sulfate utilisé (pr.5ml de sang total)	$(SO_4^=)_{t=o}$ plasma mmol/l (valeurs mesurées)	Dilution utilisée
A	0,1 ml	4,75	1/100
B	0,2	8,10	1/100
A	0,2	9,20	1/100
A	0,3	13,40	1/200
B	0,4	16,50	1/200
A	0,5	23,20	1/200
B	0,6	24,80	1/250
B	0,8	31,60	1/200
B	1	40,10	1/200

(Explication dans le texte)

Ce tableau appelle les remarques suivantes :

1) La quatrième colonne indique les dilutions utilisées pour la mesure finale de radio-activité ; elle dépend naturellement de la concentration initiale.

2) Chaque ligne du tableau correspond à une concentration de $SO_4^=$. Pour chaque concentration une cinétique a été étudiée. Deux échantillons ont été utilisés, A et B, dont les volumes globulaires de départ n'étaient pas identiques, ce qui explique que 0,2 ml de plasma de A remplacés par 0,2 ml de "Ringer -sulfate" entraîne une concentration en sulfate = 9,20 mmol/l alors que 0,2 ml de plasma de B remplacé par le même volume de même "Ringer" correspond à une concentration en sulfate = 8,10 mmol/litre.

III. Schéma général d'une expérience de cinétique

On prend, à titre d'exemple, la concentration en $SO_4^=$ du milieu extra-globulaire = $4,75 \times 10^{-3}$ mmol/ml. Le volume plasmatique initial est V = 2,8 ml. On reconstitue 5 ml de sang avec 2,8 ml de plasma contenant $^{35}SO_4$. Les globules sont abandonnés au contact de ce plasma, à la température du laboratoire durant des

temps variables. Le dosage des sulfates dans le liquide extra-globulaire est réalisé au bout de 20, 50, 90, 135, 210, 360 minutes. On peut ainsi connaître la quantité de sulfate disparue du plasma que nous avons rapporté à 100 ml de globules (Tableau XII).

TABLEAU XII

Pénétration du sulfate dans les globules lorsque $(SO_4^=)_{t=o}$ plasma = 4,75 mmol/l

Temps min.	$(SO_4^=)$ mmol/ml plasma	V_p ml	Disparition du $SO_4^=$ (mmole)		
			par ml de plasma	dans le vol. V_p	rapportée à 100 ml de glob.
0	0,00475	2,8	0	0	0
20	0,00455	"	0,00020	0,00056	0,025
50	0,00445	"	0,00030	0,00084	0,038
90	0,0044	"	0,00035	0,00112	0,046
135	0,0044	"	0,00035	0,00100	0,046
210	0,0044	"	0,00035	0,00100	0,046
360	0,0044	"	0,00035	0,00100	0,046

On constate ainsi sur le tableau précédent que :

1) Il n'y a pas dans le temps de modification du volume globulaire, ce qui se conçoit puisque moins de 1/10 du plasma est remplacé par du "Ringer" qui est d'ailleurs iso-osmotique.

2) La pénétration dans les hématies paraît terminée au bout de 90 minutes (en accord avec les travaux de RICHMOND et HASTINGS (58)).

IV. Exposé d'ensemble des résultats

Nous nous sommes proposés d'étudier, pour chaque concentration initiale en $SO_4^=$ du milieu extra-globulaire la cinétique de la pénétration, de la façon qui vient d'être indiquée, ce qui conduit au Tableau XIII à double entrée. On peut lire dans les lignes la pénétration globulaire, en fonction du temps, pour une concentration extra-globulaire donnée ; les colonnes indiquent, pour un temps de contact donné, la quantité de SO_4 dans les globules en fonction de la concentration extra-globulaire.

TABLEAU XIII

Temps (min)	0	20	50	90	135	150
(x) $(SO_4^{=})$ (a)	0,00475	0,00455	0,00445	0,0044	0,0044	
(b)	0	0,0250	0,038	0,046	0,046	
$(SO_4^{=})$.	0,0081	0,0079	0,0076	0,0075		0,0075
	0	0,033	0,073	0,079		0,079
"	0,0092	0,0089	0,0086	0,0085	0,0085	
"	0	0,044	0,076	0,089	0,089	
"	0,0134	0,0129	0,0125	0,0124	0,0124	
"	0	0,063	0,114	0,127	0,127	
"	0,0165	0,0161	0,0157	0,0155		0,0155
"	0	0,053	0,106	0,132		0,132
"	0,0232	0,0226	0,0221	0,0219	0,0219	
	0	0,094	0,140	0,165	0,165	
"	0,0248	0,0241	0,0238	0,0236		0,0235
"	0	0,09	0,132	0,158		0,170
"	0,0316	0,0308	0,0305	0,0303		0,303
"	0	0,106	0,146	0,172		0,172
"	0,040	0,0395	0,039	0,039		0,039
"	0	0,106	0,159	0,172		0,172

(x) Résultats exprimés a) en mmol/ml de plasma
b) en mmol pénétrant pour 100ml de globules

Remarquons, de plus que l'on n'a pas considéré de temps supérieur à 150 minutes. Nous avons pu, en effet, constaté dans toutes nos expériences que le phénomène est, à ce moment là, terminé, comme le montre d'ailleurs à titre d'exemple l'expérience indiquée précédemment. L'équilibre est atteint, et la pénétration se stabilise en fonction du temps. C'est ce que montrent les valeurs obtenues pour la disparition de sulfate plasmatique qui demeurent constantes à partir de 135-150 min., aux erreurs d'expérience près (1 à 2 p.100).

La figure 14 présente ces résultats.

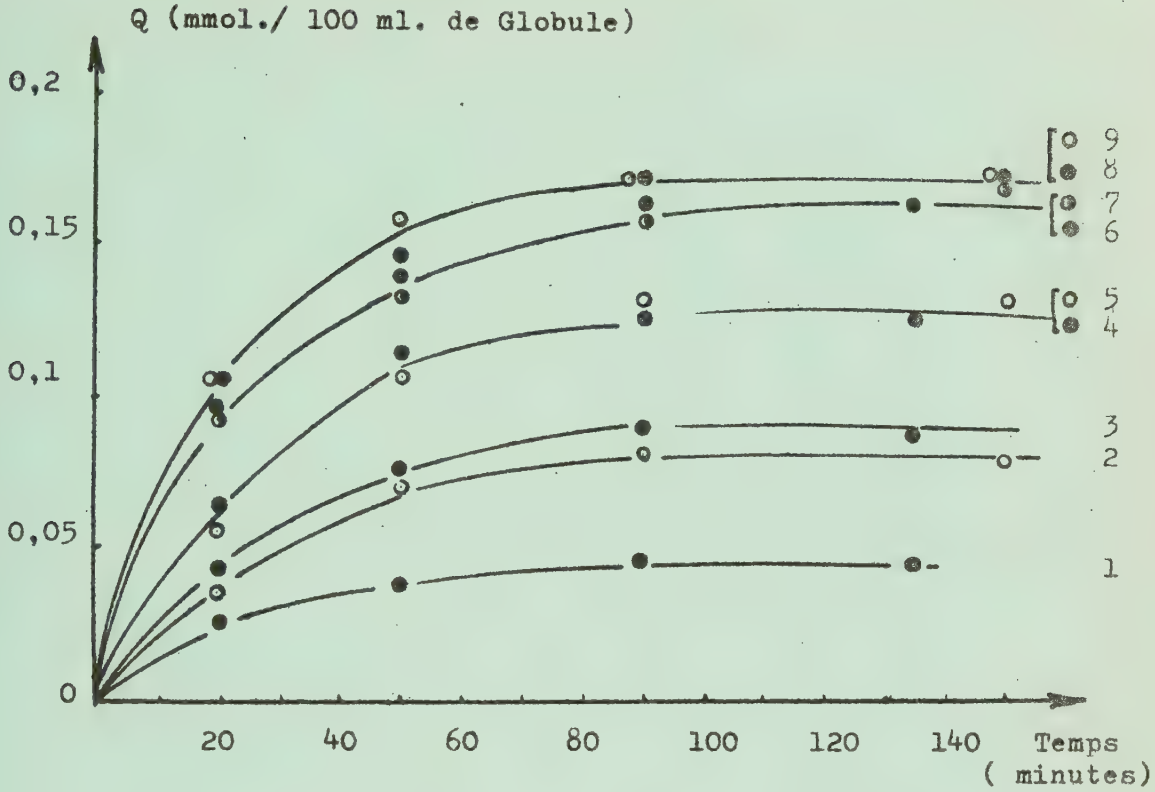


Figure 14 : Cinétique de la pénétration des sulfates dans les globules. Chaque courbe correspond à une concentration initiale donnée.

Courbe 1	$(SO_4^{=})_o$	=	4,75	mmol./l de Plasma
2		=	8,10	" "
3		=	9,20	" "
4		=	13,40	" "
5		=	16,50	" "
6		=	23,20	" "
7		=	24,75	" "
8		=	31,60	" "
9		=	40,10	" "

V - EXPLOITATION DES RESULTATS

Rôle de la concentration plasmatique initiale et du temps de contact. Evaluation des coefficients de tranferts

Etant donné que la pénétration des sulfates alcalins dans les globules dépend à la fois de la concentration extérieure initiale en sulfate et du temps de contact entre globules et plasma, on se propose de discuter les résultats précédents de deux façons :

1°) On considèrera un temps donné : soit Q la quantité de sulfate se trouvant alors dans les globules. Si P_o désigne la quantité existant au départ dans le plasma, on recherchera la relation existant entre P_o et Q.

2°) P_o étant alors considéré comme un paramètre, on cherchera la relation $Q = f(t)$ afin de vérifier, en particulier, si elle est conforme aux notions théoriques indiquées antérieurement.

A. Etude de la pénétration globulaire en fonction de la concentration plasmatique initiale

A partir du tableau précédent on peut suivre l'évolution du rapport $Q/(SO_4^=)^o_{pl}$ en fonction du temps (Tableau XIV). Nous représentons sur la figure 15 les variations de $Q/(SO_4^=)^o_{pl}$ à l'équilibre (135-150'), en fonction de $(SO_4)^o_{pl}$. On remarque que la courbe ainsi représentée a une partie rectiligne lorsque P_o n'est pas trop élevée (environ $(SO_4^=) \leqslant$ 10 à 13 mmol/l).
On admettra donc que, pour une durée courte donnée, si P_o est suffisamment faible

$$\frac{Q}{P_o} = c^{te}$$

Le fait que Q/P_o n'est pas constant, pour toutes valeurs de P_o signifie que la diffusion globulo-plasmatique telle que nous l'avons étudiée n'est plus un phénomène rigoureusement pur lorsque P_o augmente.

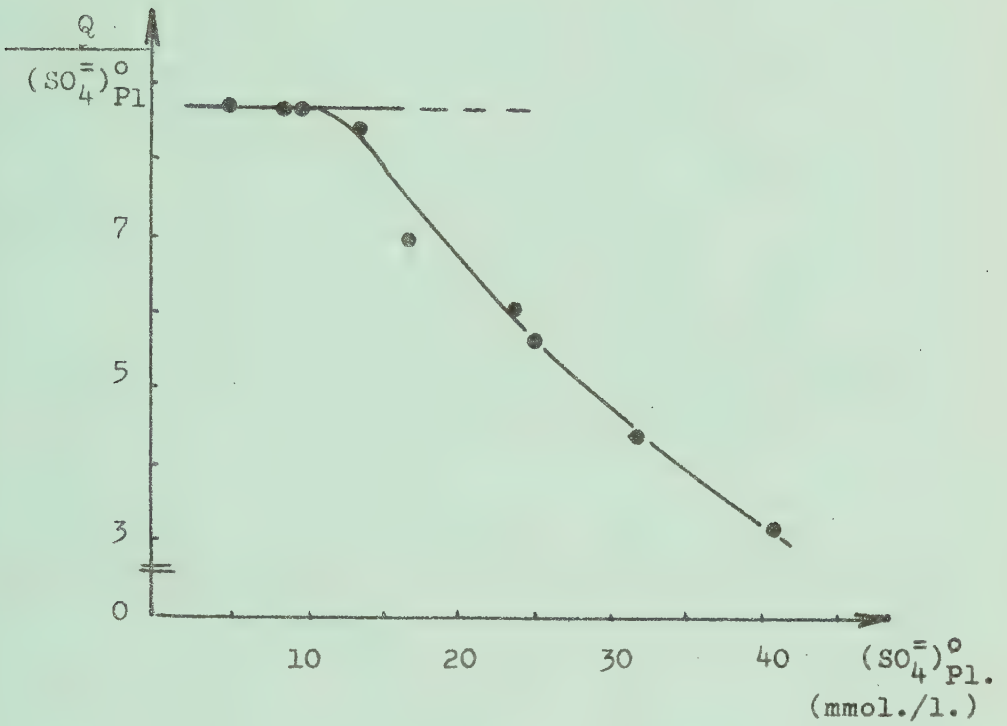


Figure 15 : Evolution du rapport Q/P_o en fonction de P_o.

Les volumes des 2 compartiments demeurant constants, on peut utiliser ainsi les concentrations ou les quantités totales, indifféremment.

TABLEAU XIV

$\frac{Q}{(SO_4^{=})^o_{pl}}$	Temps (minute)				
	20	50	90	135	150
pour P_o = 4,75 mmol/l	$5,2.10^{-3}$	$8 .10^{-3}$	$9,7.10^{-3}$	$9,7.10^{-3}$	
8,10	4	8,9	9,7		$9,7.10^{-3}$
9,20	4,1	8,3	9,7	9,7	
13,40	4,7	8,5	9,5		9,5
16,50	3,2	6,4	8		8
23,20	4	6	7,1	7,1	
24,80	3,3	4,7	6		6,7
31,60	3,3	4,6	5,4		5,4
40,60	2,6	4	4,1		4,2

B. Etude de la pénétration dans les globules en fonction du temps, la concentration étant constante

Nous avons vu antérieurement (p.43) que Q peut être défini en fonction de t par la relation :

$$Q = Q_\infty \ (1 - e^{-(k_1 + k_2)\, t}) \qquad (3)$$

dans laquelle :

Q_∞ = quantité de sulfate ayant pénétré dans les globules lorsque $t \to \infty$ (devient très grand). (x)

k_1 est le coefficient de transfert, du plasma vers les globules.

k_2 est le coefficient de transfert, des globules vers le plasma.

On peut considérer que cette relation contient la concentration initiale en sulfate dans le plasma comme paramètre puisque nous avons vu que, si on désigne par P_o la quantité de sulfate présente, au début de l'expérience, dans le plasma, on a (p.43)

$$Q_\infty = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \cdot P_o$$

(x) Le tableau XIII et la figure 14 montrent que si t > 90'
$Q = c^{te} = Q_\infty$

La proportionnalité entre Q et P_o prévue théoriquement est, comme nous venons de le voir, vérifiée pour les faibles valeurs de P_o. La relation (3) peut prendre la forme :

$$\frac{Q\infty - Q}{Q\infty} = e^{-kt}$$

en posant $k = k_1 + k_2$. C'est sous cette forme que nous nous en proposons la vérification : k peut se calculer par la relation :

$$k = -\frac{2,3}{t} \log \frac{Q\infty - Q}{Q\infty}$$

Le tableau XV indique les valeurs obtenues.

TABLEAU XV

$(SO_4)^{\circ}_{Pl}$ (mmol/l)	Temps (min.)	Q (mmole)	$\frac{Q\infty - Q}{Q\infty}$	$\log \frac{Q\infty - Q}{Q\infty}$	$K(min^{-1})$	Valeur moyenne
4,75	20 50 90	0,025 0,038 0,046	0,46 0,17	- 0,337 - 0,759	0,038 0,035	0,0365
8,10	20 50 90	0,033 0,073 0,079	0,58 0,08	- 0,236 - 1,096	0,027 0,050	0,0385
9,20	20 50 90	0,044 0,076 0,089	0,50 0,15	- 0,302 - 0,844	0,035 0,038	0,0365
13,4	20 50 90	0,063 0,114 0,127	0,5 0,10	- 0,301 - 0,992	0,034 0,045	0,0395
16,5	20 50 90	0,053 0,106 0,132	0,6 0,2	- 0,221 - 0,70	0,026 0,032	0,029
23,2	20 50 90	0,094 0,140 0,165	0,43 0,15	- 0,367 - 0,824	0,042 0,037	0,0395
24,80	20 50 90 150	0, 09 0,132 0,159 0,170	0,47 0,22 0,065	- 0,328 - 0,658 - 1,004	0,038 0,030 0,030	0,033
31,6 et 40,1	20 50 90	0,106 0,146 0,172	0,39 0,15	- 0,409 - 0,815	0,045 0,037	0,041

k est bien constant avec une bonne approximation, pour $(SO_4^{=}) < 13,4$ mmol/l

$$k = 0,037$$

à l'erreur expérimentale près qui est de l'ordre de 3 à 5 p.100.

Conséquence des faits précédents : Evaluation des "coefficients de transfert globulo-plasmatique"

1) L'étude de la cinétique de pénétration des sulfates dans les globules nous a conduit à calculer l'expression $k_1 + k_2$, somme des deux coefficients de transfert, à partir de la relation :

$$k = k_1 + k_2 = -\frac{2,3}{t} \log \frac{Q\infty - Q}{Q\infty}$$

Q et $Q\infty$ sont, comme on l'a vu, déduits des résultats expérimentaux.

2) D'autre part, les données théoriques et les résultats numériques obtenus montrent que, si la concentration plasmatique initiale P_o en sulfates est suffisamment faible, la quantité de sulfates pénétrant dans les globules est proportionnelle à P_o :

En particulier, au bout d'un temps infini :

$$Q\infty = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \cdot P_o$$

On peut donc calculer l'expression $\frac{k_1}{k_1 + k_2} = \frac{Q\infty}{P_o}$

Connaissant d'autre part $k_1 + k_2$ on en déduit les valeurs de k_1 et de k_2

$(SO_4^{=})_{t=o}$ plasma (mmol/ml)	P_o (x)	$Q\infty$	$\frac{k_1}{k_1 + k_2} = \frac{Q\infty}{P_o}$	k_1	k_2
0,00475	0,604	0,047	0,079	0,0028	0,0337
0,00810	1,079	0,0795	0,073	0,0028	0,0357
0,0092	1,170	0,089	0,076	0,0028	0,0336
0,0134 (xx)	1,704	0,1272	0,074	0,0029	0,0366

(x) P_o est la quantité de sulfate se trouvant dans un volume de plasma correspondant à un volume globulaire de 100 ml.

(xx) Au-delà de cette concentration k_1 décroît rapidement de 0,0021 à 0,0011, k_2 croît jusqu'à 0,035 lorsque $(SO_4^{=})_{pl}$ croît de 0,0165 à 0,0401 mmol/ml.

Les données numériques obtenues indiquent donc que k_2 est environ 10 fois plus grand que k_1.

Remarque -

Par un raisonnement analogue à celui développé page on peut montrer que, théoriquement, la quantité de sulfates présents dans le plasma au bout d'un temps élevé (P43) est reliée à la quantité présente au temps o, (P_o), par la relation :

$$\frac{P_\infty}{P_o} = \frac{k_2}{k_1 + k_2}$$

On peut donc tout aussi bien, à partir des résultats expérimentaux, calculer le rapport $k_2/k_1 + k_2$ et en déduire comme précédemment les constantes k_1 et k_2. C'est ce qui figure sur le tableau suivant.

$(SO_4^=)^o$ Pl (mmol/ml)	P_o	P_∞	$\frac{k_2}{k_1 + k_2} = \frac{P_\infty}{P_o}$	k_2	k_1
0,00475	0,604	0,55	0,90	0,0328	0,0037
0,00810	1,079	1	0,92	0,0349	0,0031
0,0092	1,17	1,08	0,91	0,0332	0,0033
0,0134	1,704	1,577	0,92	0,0358	0,0032

Les résultats semblent plus concordants. Ceci tient au fait que P_o et P_∞ sont assez voisins l'un de l'autre alors que Q_∞ est petit devant P_o.

Signification des coefficients de transferts

En considérant les deux relations :

$$Q_\infty = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \cdot P_o$$

$$P_\infty = \frac{k_2}{k_1 + k_2} \cdot P_o$$

on déduit que $\frac{Q\infty}{P\infty} = \frac{k_1}{k_2}$ est indépendant de P_o.

Le rapport des deux coefficients de transfert k_1 et k_2 fixe donc la valeur du rapport de répartition des sulfates entre globules et plasma.

Discussion -

Les résultats précédents (Tableaux XIV, XV et suivants) montrent que, lorsque la concentration initiale du plasma en sulfate est relativement faible (inférieure à 10 mmol/l) les phénomènes de diffusion globulo-plasmatique des sulfates sont assez bien représentés par les équations de la diffusion en régime variable. Dans ce cas, les constantes de transfert k_1, k_2 gardent pratiquement la même valeur quelle que soit la quantité de sulfate contenue dans le plasma si celle-ci reste inférieure à 10 mmol/l.

Pour les concentrations en sulfate plus élevées le calcul précédent n'est plus applicable ou du moins ne rend plus compte des faits observés. Ceci peut être dû soit à des variations importantes du potentiel de membrane ou de sa perméabilité, soit plus certainement aux deux. De plus, une concentration relativement élevée en sulfate peut, en outre, modifier de façon importante la composition et la structure physico-chimique des milieux extra et intra globulaire et par là même modifier les conditions de passage des ions.

Il semble donc que les calculs théoriques simples que nous avons utilisés sont de moins en moins acceptables au fur et à mesure que les concentrations en sulfate s'élèvent, ce que montre d'ailleurs la figure 15 (constance relative du rapport Q/P_o lorsque la concentration en sulfate reste inférieure à 10 mmol/l). Ces résultats sont à rapprocher de ceux de PASSOW (59) qui montrent également sur des globules de cheval, dans des conditions expérimentales voisines des nôtres, que la pénétration du sulfate était proportionnelle au gradient de potentiel électrochimique de cet ion à condition que la concentration extérieure en sulfate soit inférieure à 10 mmol/l.

De toute façon, l'intérêt des observations précédentes est de montrer qu'un calcul simple, "économique" (au sens de SOLOMON (60) (x)) peut, au moins dans les limites de concentration indiquées, servir de base à l'interprétation des faits.

(x) "The guiding principle is economy" dit cet auteur dans son étude des cinétiques avec traceur dans les systèmes biologiques.

VI - ETUDE DU RAPPORT DE DISTRIBUTION DE L'ION SO_4^{--} ENTRE GLOBULES ET PLASMA

I. Expression du rapport

Posons : $(SO_4^{=})_G$ = concentration des sulfates en mmole par litre d'eau globulaire, au temps t.

$(SO_4^{=})_P$ = concentration des sulfates, au même temps t, en mmole par litre de plasma (assimilé à l'eau plasmatique).

Le rapport de distribution r est :

$$r = \frac{(SO_4^{=})_G}{(SO_4^{=})_P} \qquad (1)$$

II. Détermination pratique de r.

Posons :

V_P = volume de plasma contenu dans 5 ml de sang

V_G = volume de globules contenu dans 5 ml de sang

V'_G = volume d'eau totale contenu dans le volume V_G

$$V'_G = \frac{66}{100} \cdot V_G \qquad \text{(cf. page 12)}$$

q = quantité de sulfates (enmmole) contenus au temps t dans le volume V_G c'est-à-dire dissous dans le volume V'_G supposé utilisable en totalité :

$$q = (SO_4^{=})_G \times V'_G \qquad (2)$$

$(SO_4^{=})_P^o$ = concentration initiale des ions sulfates (en mmole par litre de plasma).

La quantité de sulfates ayant quitté le volume V_P de plasma, au temps t est :

$$q = (SO_4^{=})_P^o \cdot V_P - (SO_4^{=})_P \cdot V_P$$

$$q = \left[(SO_4^{=})_P^o - (SO_4^{=})_P\right] V_P \quad (3)$$

cette expression est correcte car, au cours de l'expérience effectuée dans de strictes conditions d'iso-osmoticité, il n'y a pas de variation des volumes globulaire et plasmatique. (Voir note)

En combinant les relations (1) (2) et (3) on obtient l'expression suivante permettant de déterminer r.

$$r = \frac{(SO_4^{=})_P^o - (SO_4^{=})_P}{(SO_4^{=})_P} \cdot \frac{V_P}{V'_G}$$

III. Résultats expérimentaux

Comme dans le paragraphe précédent, on étudie la valeur de r, d'une part en fonction du temps, pour une valeur donnée de la concentration plasmatique initiale ; d'autre part, en fonction de cette concentration, ce qui conduit au tableau XVI résumant l'expérimentation effectuée.
L'ensemble des résultats est, d'autre part, schématisé sur le tableau XVII à double entrée dans lequel les lignes horizontales indiquent la cinétique d'évolution du rapport r, la concentration initiale en sulfates restant constante et les colonnes indiquant pour chaque valeur du temps de contact, la variation de r en fonction de la concentration initiale en sulfates.

La figure 16 donne une représentation graphique de ces derniers résultats à l'équilibre.

NOTE : Ceci n'est vrai que pour $(SO_4)^o_{P1} \leqslant$ 25-30 mmole/l qui n'entraîne que 2 à 2,5 p.100 de contraction du volume globulaire. Variations de l'ordre de l'erreur expérimentale.

TABLEAU XVI

Temps (min)	$(SO_4^{=})_P$ (mmol/l)	$(SO_4^{=})_P^o - (SO_4^{=})_P$	$\frac{V_P}{V'_G}$	r
0	4,75	0	1,9	0
20	4,55	0,20	"	0,08
50	4,45	0,30	"	0,13
90	4,40	0,35	"	0,15
135	4,40	0,35	"	0,15
0	8,10	0	2	0
20	7,90	0,20	"	0,06
50	7,60	0,50	"	0,13
90	7,50	0,60	"	0,16
150	7,50	0,60	"	0,16
0	9,20	0	1,9	0
20	8,90	0,30	"	0,06
50	8,60	0,60	"	0,13
90	8,50	0,70	"	0,15
135	8,50	0,70	"	0,15
0	13,4	0	1,9	0
20	12,9	0,5	"	0,07
50	12,5	0,9	"	0,13
90	12,4	1	"	0,15
135	12,4	1	"	0,15
0	16,5	0	2	0
20	16,1	0,40	"	0,05
50	15,7	0,80	"	0,10
90	15,5	1	"	0,13
150	15,5	1	"	0,13
0	23,2	0	1,9	0
20	22,6	0,6	"	0,05
50	22,1	1,1	"	0,09
90	21,9	1,3	"	0,11
135	21,9	1,3	"	0,11
0	24,80	0	2	0
20	24,1	0,7	"	0,06
50	23,8	1	"	0,08
90	23,6	1,2	"	0,10
150	23,5	1,3	"	0,11

TABLEAU XVI (Suite)

Temps (min)	$(SO_4^=)_P$ (mmol/l)	$(SO_4^=)_P^o - (SO_4^=)_P$	$\frac{V_P}{V'_G}$	r
0	31,6	0	2	0
20	30,8	0,8	"	0,05
50	30,5	1,1	"	0,07
90	30,3	1,3	"	0,09
150	30,3	1,3	"	0,09
(x) 0	40,1	0	2	0
20	39,5	0,6	"	0,03
50	39,0	1,1	"	0,05
90	39,0	1,1	"	0,05
150	39,0	1,1	"	0,05

TABLEAU XVII

Evolution du rapport de distribution des Sulfates en fonction du temps et de la concentration extérieure en $SO_4^=$ au temps zéro

	20 mn	50 mn	90 mn	135 mn	150 mn
4,75mmol/l	0,08	0,13	0,15	0,15	
8,10	0,06	0,13	0,16		0,16
9,20	0,06	0,13	0,15	0,15	
13,40	0,07	0,13	0,15	0,15	
16,50	0,050	0,10	0,13		0,13
23,20	0,05	0,09	0,11	0,11	
24,75	0,06	0,08	0,10		0,11
31,60	0,05	0,07	0,09		0,09
40,10	0,03	0,05	0,05		0,05

(x) Il n'a pas été fait ici de correction pour les variations de volume globulaire et plasmatique de l'ordre de 3 p.100.

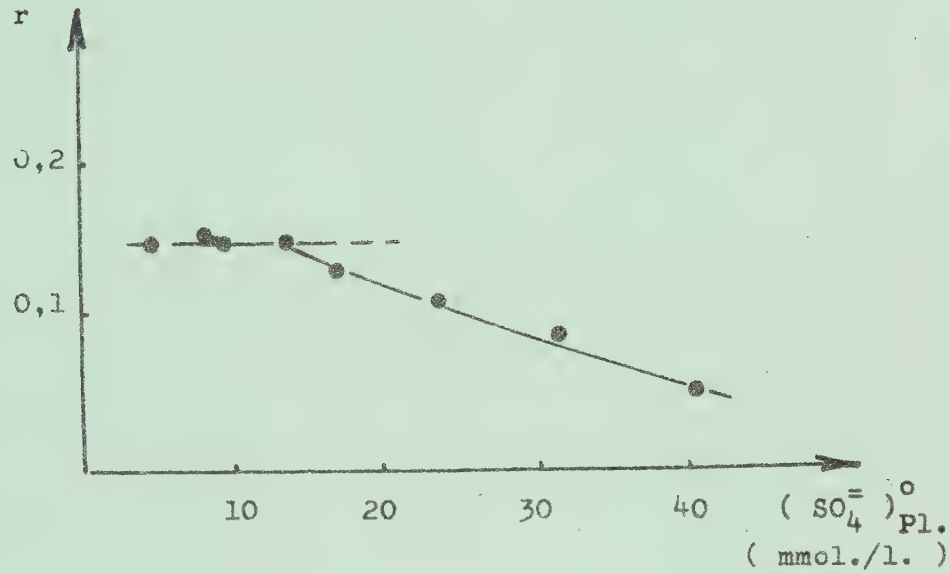


Figure 16 : Evolution du rapport de distribution de l'ion Sulfate , à l'équilibre, entre les globules et le plasma, en fonction de la concentration initiale en sulfate du milieu exterieur.

La différence observée entre la valeur de r à l'équilibre ($\neq 0,15$) et celle du rapport k_1/k_2, voisin de 0,1, provient de ce qu'on utilise le volume de l'eau globulaire pour le calcul de la concentration globulaire alors que dans le calcul des constantes k_1 et k_2 les concentrations en $SO_4^=$ ont été calculées par rapport au volume globulaire total.

On vérifie cependant qu'en utilisant le volume globulaire total dans le calcul de r, ce rapport est égal à 0,1 pour $(SO_4^=)^o_p$ inférieur à 13,4 mmol/l.

Ce nouvel accord entre les résultats expérimentaux et les solutions des équations de la page 43 , bien que limité à $0 < (SO_4^=) < 10$ mmol/l, confirme donc les conclusions du chapitre qui précède. Il permet d'écrire, ce qu'on pouvait déjà supposer, $k_1 P\infty = k_2 Q\infty$. Cette égalité n'est autre que celle de deux flux. A l'équilibre donc on observe un flux "net" égal à zéro.

NOTE -

Il paraît intéressant de rapprocher ces résultats de ceux récents de RICHMOND et HASTINGS (58). Ces auteurs étudiant, in vitro, l'équilibre de distribution du sulfate, entre les globules rouges et le plasma de chien ou de lapin, trouvent que ce rapport évolue linéairement en fonction du pH : r augmentant par diminution du pH ($r_1 = - apH + b$). Ils constatent de plus que la droite ainsi définie évolue parallèlement à celle que l'on obtiendrait si la distribution de $SO_4^=$ se faisait suivant une répartition due à une équilibre de DONNAN ($r_2 = - apH + b'$), voir VAN SLYKE et coll. (61) (62)

Donc $$r_1 = \frac{(SO_4^=)_G}{(SO_4^=)_P} \qquad r_2 = \frac{(Cl^-)^2_G}{(Cl^-)^2_P}$$

avec $$r_2 = r_1 + (b + b')$$

En première analyse ils concluent de ce parallélisme, modifiant pareillement les deux rapports pour une même variation de pH, que la différence observée entre r_1 et r_2 proviendrait d'une fixation des ions sulfates sur les protéines du plasma (ceci devant faire l'objet d'une publication non encore parue).

Or, il se trouve que nos propres résultats, bien qu'obtenus avec du sang de cheval, indiquent pour un pH voisin de 7,4 - 7,5 un rapport de 0,16 alors que celui obtenu par ces auteurs aux mêmes conditions de pH était voisin de 0,2. Ceci laisse donc supposer une analogie de comportement entre les sangs de chien et de lapin d'une part, de cheval d'autre part, qui permettrait donc d'expliquer la distribution d'ions sulfates observée, par une répartition due à un équilibre de DONNAN.

VII - MECANISME DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE DES SULFATES ALCALINS

On considèrera deux problèmes :

1°) Essai de démonstration de la pénétration intra-globulaire des ions SO_4^{--}

2°) Echanges ioniques liés à la diffusion de SO_4^{--}

1°) Pénétration intra-globulaire de SO_4^{--}

Les courbes du type de celle de la figure 14 n'apportent pas la preuve que l'appauvrissement extra-globulaire entraîne un enrichissement intra-globulaire car la forme même de ces courbes peut correspondre à un isotherme d'adsorption. Et, dans ce cas l'appauvrissement extra-globulaire ne serait dû qu'à une fixation à la surface limitante des hématies.

La difficulté du dosage d'une substance quelconque intra-globulaire en provenance du plasma réside dans le fait que les hématies restent toujours imprégnées de la solution extérieure de sorte que d'importantes erreurs sont réalisées si l'on ne "lave" pas correctement les cellules. Or, le lavage lui-même comporte une source d'erreurs de principe, la possibilité de voir rediffuser vers l'extérieur la substance intra-globulaire. D'où l'importance du choix du liquide de lavage.

Ainsi, CLARKSON et MAIZELS (63) (64) lavant rapidement, avec une solution de KCl, des globules de poulets, des globules humains normaux et pathologiques (hématies falciformes), distinguent plusieurs provenances du sodium recueilli comme le montre le tableau XVIII :

TABLEAU XVIII

Nature des globules	Na recueilli par lavage en mEq/l de glob.	Na en provenance du plasma intercellulaire		Na en provenance des globules	
		en mEq/ l glob.	en p.100	en mEq/ l glob.	en p.100
Hommes	5,2	3	58	2,2	42
Poulet	7,5	4,5	60	2	40
Globules falciformes	20	12	60	8	40

Cela étant, voici l'expérimentation réalisée :

On met en contact des hématies de cheval et une solution iso-osmotique de K_2SO_4 marquée par ^{35}S. Les hématies sont séparées puis lavées plusieurs fois par immersion dans un volume équivalent de solution isotonique de glucose (50 p.1000). La détermination de la radio-activité est faite sur les liquides de lavage puis finalement sur les globules eux-mêmes après hémolyse, dilution et calcination. Voici les résultats portant sur 5 ml de sang :

SO_4^{--} contenu dans le :

Volume extra-globulaire avant contact	0,314	mmoles
Volume extra-globulaire après contact	0,270	"
Premier liquide de lavage	0,003	"
Deuxième liquide de lavage	0,002	"
Troisième " " "	0,002	"
Globules	0,035	"

Cette expérience montre que :

1°) La quantité de sulfates contenue dans les liquides de lavage diminue régulièrement.

2°) La quantité de SO_4^{--} retrouvée dans les globules après le dernier lavage est sensiblement égal à la quantité correspondante perdue par le plasma.

3°) Le bilan de l'expérience se solde par un écart minime entre la quantité de sulfate ajoutée et la quantité retrouvée.

On peut,semble -t-il, en conclure que le sulfate dosé dans les globules était un constituant du milieu intra-globulaire et donc qu'il y a eu passage des sulfates à l'intérieur des hématies.

2°) Echanges chlorures - sulfates

Conformément aux travaux de HARRIS (39) sur la pénétration des sulfates dans les globules et aux travaux de PARPART, SCHWEITZER, LUCKWER, PASSOW et DUNKER (56) (57) (65) (66), la démonstration de la sortie d'ions Cl^- correspondant à l'entrée des ions SO_4^{--} est aisée.

a) Données du problème

L'explication du phénomène est vraisemblablement la suivante : les ions SO_4^{--} contenus en quantité importante dans la solution extra-globulaire, pénètrent dans les hématies par suite de leur gradient de concentration (phénomène de diffusion). Le maintien de l'équilibre électrique entraîne une substitution d'anions : 2 Cl^- sortant pour chaque ion SO_4^{--} entrant, d'où une diminution du nombre d'osmoles intra-globulaires. Ce déséquilibre osmotique entraîne alors l'expulsion d'une certaine quantité d'eau d'où rétraction globulaire (fig.17) pouvant atteindre 10 p.100 du volume globulaire lorsque la totalité de l'osmolarité est assurée par une solution iso-osmotique de sulfates alcalins.

De plus, on montre ainsi un fait susceptible de généralisation en milieu iso-osmotique, lorsque se produisent des modifications de volume des hématies (diminution dans le cas particulier) par transfert de liquide, elles ne sont que la conséquence d'un transfert ionique initial (ou de la diffusion initiale dans le cas de l'urée, du glycérol), à la condition que ce transfert ait entraîné une modification du nombre total de particules c'est-à-dire, un déséquilibre osmotique entre milieu intérieur et milieu extérieur. Cela est si vrai que si l'échange ionique est réalisé entre ions de même valence (par exemple NO_3^-/Cl^- ou CO_2H^-/Cl^-) il n'y a pas de modification aussi appréciable du volume globulaire (voir 1ère partie, fig. 9). Encore, une analyse plus poussée des faits devrait-elle prendre en considération les modifications de dissociation des protéines globulaires correspondant à ces échanges, ce qui n'est pas l'objet de ce travail.

De sorte qu'au total, des phénomènes de diffusion globulo-plasmatique réalisés dans des conditions aussi rigoureuses que possible d'iso-osmoticité peuvent entraîner des modifications de volume globulaire. Et on rappelera pour mémoire le fait bien connu que les hématies subissent une hémolyse quasi-instantanée dans des solutions iso-osmotiques pures de composés rapidement diffusibles (urée ou glycérol). L'égalité de répartition rapidement réalisée rend le milieu intra-globulaire très fortement hyper-osmotique par rapport au milieu extérieur (p. 33) d'où appel d'eau massif et éclatement des hématies.

Et le cas des ions SO_4^{--} est alors particulièrement instructif car il montre un fait qui, à priori, pouvait paraître paradoxal : les ions SO_4^{--} diffusibles entraînant une rétraction globulaire c'est-à-dire une contradiction avec ce qui est observé dans

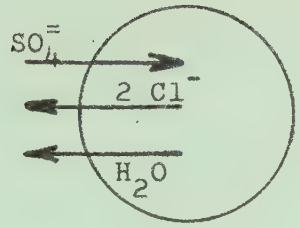


Figure 17

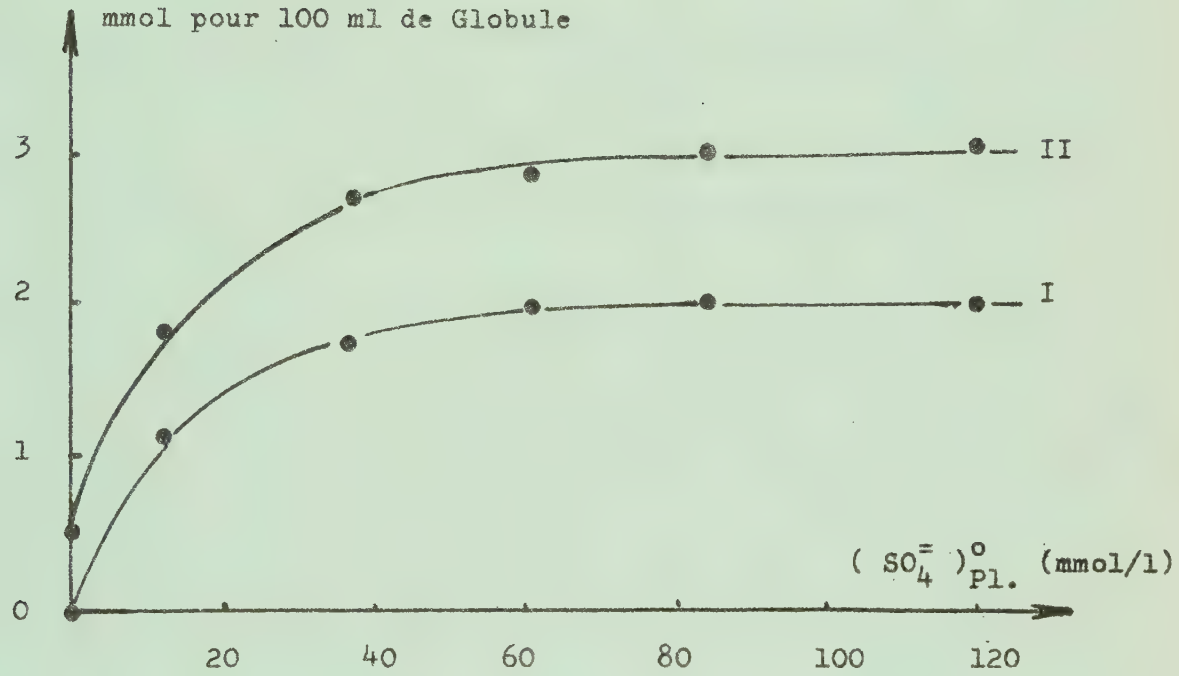


Figure 18 : Courbe I : Pénétration de $SO_4^=$ dans les globules (en fonction de la concentration plasmatique initiale en sulfate).

Courbe II : Sortie de Cl^- des globules vers le plasma (en fonction de la concentration plasmatique initiale en sulfate).

Les résultats sont exprimés en mmol de $SO_4^=$ ou de Cl^- pour 100 ml de globules, ils sont la moyenne des chiffres obtenus sur 3 expériences similaires effectuées sur 3 échantillons de sang différent.

le cas de l'urée et du glycérol. Et c'est le mécanisme d'échange ionique entre des ions d'inégale valence qui, au total, aboutit à une diminution des particules intra-globulaires, d'où sortie d'eau.

b) Protocole expérimental

1) Etant donné la quantité relativement faible d'ions SO_4^{--} pénétrant dans les hématies, on peut prévoir que la sortie correspondante d'ions Cl^- sera faible également. On ne peut donc envisager de doser les chlorures provenant des hématies dans un milieu extra-globulaire, qui en contiendrait déjà une quantité importante. Ceci exclut l'utilisation du plasma.

2) On ne peut davantage placer les hématies dans une solution type Ringer car la complexité des échanges ioniques ne permet plus d'analyse même imparfaite des faits.

On est donc conduit à utiliser, comme milieu extra-globulaire, une solution de glucose contenant des quantités croissantes de sulfate alcalin (0 à 100 p.100) l'ensemble étant toujours iso-osmotique.

La technique est la suivante : les globules séparés de leur plasma sont lavés avec une solution isotonique ne contenant que du glucose ; on élimine ainsi le plasma interstitiel. Puis les globules lavés sont placés dans des solutions iso-osmotiques glucose-sulfates de teneur croissante en sulfate (0, 12, 36, 60, 84, 120 mmol/l) ; 120 mmol/l correspondent à une solution iso-osmotique ne contenant que SO_4^{--}. Après 1 à 2 heures de contact, on sépare par centrifugation globules et milieu extra-globulaire et, dans la solution surnageante, on dose SO_4^{--} (par mesure de la radio-activité) et Cl^- (par la méthode de Laudat - Charpentier - Volhard). On tient compte, dans l'expression des résultats, des variations de volume globulaire.

c) Résultats

Les tableaux XIX et XX indiquent les résultats obtenus à partir de 3 expériences identiques effectuées sur trois sangs différents. Afin de les rendre comparables, les quantités de SO_4^{--} entrées et de Cl^- sorties sont transformées en quantités qui pénètreraient si on avait au départ 100 ml de globules.

d) Discussion

La représentation graphique des 2 phénomènes (rentrée de SO_4^{--} et sortie de Cl^-) conduit à la fig.18 qui montre bien que l'un et l'autre sont liés à la concentration extérieure en SO_4^{--}. On doit, en effet, exclure une banale diffusion de Cl^- vers le milieu extra-globulaire, étant donné le parallélisme des courbes ; la participation de cette diffusion passive correspond à la quantité de Cl^- qui sort lorsque les globules sont dans une solution iso-

osmotique ne contenant que du glucose (0,5 mmol en moyenne pour 100 ml de globules) (x)

TABLEAU XIX : Sortie des Chlorures

$(SO_4^{=})^{t=o}_{ext.}$ (mmol/l)	Sortie des chlorures pour 100 ml de glob.(mmol)			
	Exp. (1)	(2)	(3)	Moyenne
0 (Glucose pur)	0,47	0,50	0,52	0,50
12	1,85	1,91	1,76	1,84
36	2,70	2,77	2,70	2,73
60	2,81	2,86	2,94	2,87
84	3,07	2,98	3,06	3,04
120 (sulfate pur)	3,00	3,00	3,17	3,06

TABLEAU XX : Pénétration des ions sulfates

$(SO_4^{=})^{t=o}_{ext.}$ (mmol/l)	Pénétration de sulfate pour 100 ml de glob.(mmol)			
	Exp. (1)	(2)	(3)	Moyenne
12	1,46	1	1	1,13
36	1,86	1,73	1,67	1,75
60	1,86	2	2	1,97
84		1,92	2,08	2
120	1,90	2,14	1,95	2

Notons enfin que nous n'avons pu vérifier, conformément aux données théoriques indiquées ci-dessus que l'échange $Cl^-/SO_4^=$ se fait dans le rapport 2 ; le rapport trouvé expérimentalement est voisin de 1,5. On peut raisonnablement penser que ce fait est dû à ce que d'autres ions que Cl^- (CO_3H^- notamment) sont impliqués dans le phénomène.

(x) On montre facilement, compte tenu du volume de plasma interstitiel retenu que Cl^- est bien sorti car la quantité dosée est nettement supérieure à celle qui est dans ce plasma.

CONCLUSION DE L'ETUDE DE LA DIFFUSION GLOBULO-PLASMATIQUE DES SULFATES ALCALINS

Nous résumerons de la façon suivante les faits rapportés dans cette deuxième partie.

I. Quelle que soit la difficulté de poser en termes rigoureux le phénomène de diffusion globulo-plasmatique, sa démonstration et son étude quantitative sont possibles si l'on se place dans des conditions aussi strictes que possible d'iso-osmoticité afin d'éliminer tout transfert osmotique préalable.

II. Au moyen de solutions de sulfate de potassium marquées par ^{35}S, la pénétration globulaire des ions $SO_4^=$ a été étudiée à la fois en fonction du temps et de la concentration plasmatique initiale.

On peut ainsi tracer deux sortes de courbes représentant :

a) L'une, la quantité de sulfates (Q) ayant pénétré dans les hématies en fonction du temps (t) pour chaque valeur de la concentration plasmatique initiale (C)

$Q = f(t)$ C est un paramètre

b) L'autre, la quantité Q ayant pénétré en fonction de C, sous la forme

$\frac{Q}{C} = f(C)$ t étant un paramètre

L'interprétation mathématique effectuée, permet alors de définir les coefficients de transfert dans les deux sens : globules → plasma et plasma → globules. Les résultats obtenus justifient bien la représentation exponentielle de la cinétique, pour $C < 10$ mmol/l.

III. L'étude théorique faite postulant que le rapport de distribution globulo-plasmatique (r) est indépendant de la concentration plasmatique initiale se trouve vérifié pour les mêmes valeurs de C.

IV. La solution extra-globulaire étant constituée par des mélanges, en proportions variables, de glucose et de sulfates alcalins, on constate que la pénétration globulaire des ions $SO_4^{=}$ correspond à une sortie des ions Cl^- en provenance des globules. Sans qu'on puisse établir de relation quantitative précise entre les 2 phénomènes, on note néanmoins qu'ils évoluent dans le même sens en fonction de la concentration extérieure en sulfates.

- TROISIEME PARTIE -

LES TRANSPORTS ACTIFS GLOBULO-PLASMATIQUES

I - INTRODUCTION : NOTION DE TRANSPORT ACTIF

II - MISE EN EVIDENCE DU TRANSFERT DE L'ION K^+ ET Na^+ CONTRE LEUR GRADIENT DE CONCENTRATION. MESURE DU FLUX NET

III - INHIBITION DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES GLOBULES ROUGES. EFFETS SUR LE TRANSFERT DES IONS K^+ ET Na^+. MESURE DES FLUX ACTIFS

IV - EFFETS DE LA VARIATION DU GRADIENT DE CONCENTRATION SUR LE MOUVEMENT PASSIF ET ACTIF DES IONS K^+ ET Na^+

ANNEXE : ROLE EVENTUELLEMENT JOUE PAR L'ANION ASSOCIE AU CATION QUI PARTICIPE AU TRANSFERT ACTIF

I - NOTION DE TRANSPORT ACTIF

La perméabilité des cellules aux substances dissoutes dans le milieu qui les entoure est un aspect important du développement et du maintien de la vie. On a pu montrer ainsi que le mouvement et la distribution des ions de part et d'autre d'une membrane biologique pouvaient s'expliquer par l'action des forces purement physiques telles que celles découlant de l'existence d'un gradient de concentration ou d'un gradient électrique. Mais dans certains cas l'action de ces forces ne suffit plus pour expliquer certains phénomènes observés comme l'accumulation du potassium dans les globules rouges, ou l'expulsion du sodium de ces mêmes globules. On a alors introduit la notion de "Transport Actif".

Comme le font remarquer ANDERSEN et USSING (67) la définition du transport actif est toute négative :

"Une substance est transportée activement si le transfert de cette substance au travers d'une membrane ne peut être expliqué par l'action de forces de diffusion, de gradient du potentiel électrique, d'entraînement de solvant ("solvent drag") ou une quelconque combinaison de ces trois forces".

Cette définition inclut non seulement le cas où une substance est déplacée contre son gradient de potentiel électrochimique (travaux de ROSENBERG (68)), mais aussi le cas où une substance est transportée le long d'un gradient plus rapidement qu'on ne l'attendrait de l'action des forces sus mentionnées.

Ce transport contre le gradient électrochimique augmente donc l'énergie libre du système. La cellule se procure cet apport énergétique supplémentaire par ses propres réactions métaboliques (énergie en provenance de la glycolyse pour des cellules non nuclées comme les globules de mammifères).

La caractérisation d'un transport actif suppose donc, d'après la définition précédente, la connaissance du comportement de la substance étudiée soumise aux seules forces physiques, et d'en déduire par comparaison si la substance se déplace passivement ou activement.

USSING et ses collaborateurs résument le comportement passif d'une substance chargée par l'équation générale suivante :

$$\text{Ln}\ \frac{\text{flux "sortant"}}{\text{flux "entrant"}} = \text{Ln}\ \frac{a_i}{a_e} + \frac{zF}{RT} \cdot E + \frac{1}{D} \int_o^{x_o} \frac{1}{g'_w} \cdot \frac{dP}{dx} \cdot dx \quad (1)$$

où le rapport des flux est exprimé en fonction de l'activité chimique de la substance des deux cotés de la membrane, de la différence de potentiel (E) et d'un terme représentant l'action de l'entraînement par le solvant.

Cette relation s'applique aussi bien aux systèmes en état d'équilibre qu'à ceux présentant un déplacement net de substance pourvu qu'il reste petit par rapport aux échanges ioniques totaux. Lorsqu'on peut négliger le phénomène d'entraînement comme c'est le cas pour les globules, on remarque que la relation devient indépendante de la structure même de la membrane.

Donc, si une substance se comporte conformément à l'équation (1), on peut affirmer qu'elle n'est pas transportée activement mais l'inverse n'est pas toujours vrai car l'équation (1) suppose que les particules qui se meuvent, le font indépendamment les unes des autres et sans s'associer à un quelconque substrat pour traverser la membrane.

Or, ces conditions ne sont pas toujours remplies ("Diffusion par échange", "Diffusion en file") ce qui introduit une différence parfois appréciable entre le comportement effectif d'une substance et celui prévu par l'équation (1) sans que pour cela le transport en question soit actif.

On voit ainsi la difficulté qu'il y a à cerner de près ces phénomènes de transport actif. L'emploi des isotopes radioactifs a fait cependant progresser considérablement ces dernières années leur étude. D'importantes monographies permettent actuellement d'en faire le point. [(69)à(74), (39)]

Dans le cas des globules rouges, l'équation (1) n'est pas directement utilisable car E n'est pas mesurable directement, mais peut être exprimé compte tenu de la formule de NERNST :

$$\frac{zF}{RT} \cdot E = \text{Ln}\ \frac{(Cl)_i}{(Cl)_e} \quad (2)$$

D'autre part, en assimilant, pour un ion donné, activité (a) et concentration (c), le rapport :

$$\frac{a_i}{a_e} \quad \text{devient} \quad \frac{c_i}{c_e}$$

Enfin, si les transferts de solvant sont négligeables, le dernier terme de la relation (1) s'annule et on a l'équation simplifiée :

$$\frac{\text{Flux sortant}}{\text{Flux entrant}} = \frac{c_i}{c_e} \cdot \frac{(Cl)_i}{(Cl)_e} \qquad (3)$$

La différence de potentiel mesurée indirectement entre le milieu globulaire et le plasma étant de - 9 mV (voir note), on conçoit facilement le transport actif du sodium (contre le gradient de concentration et le gradient électrique) mis en évidence par HARRIS (75) et DANOSKI (76). Le potassium pourrait paraître s'accumuler suivant ce même gradient de potentiel mais la valeur de celui-ci est nettement insuffisante pour rendre compte de la forte concentration du potassium dans les globules ; les ions K^+ sont donc aussi soumis à un transport actif (HARRIS (75), MAIZELS (77).

Des recherches récentes ont aussi montré que ces transferts actifs du potassium et du sodium étaient étroitement solidaires l'un de l'autre (HARRIS et MAIZELS (78), TOSTESON (79)).

Nous voudrions signaler tout particulièrement les travaux de GLYNN (80) (81) qui reprennent en détails tous les mouvements ioniques s'établissant au travers de la membrane des globules rouges. L'emploi des isotopes radio-actifs lui permet ainsi de préciser avec une finesse extrême ce qui est mouvement actif de ce qui est mouvement passif de diffusion (diffusion "libre", par"échange", ou en "file").

La nature du mécanisme de ces transports demeure encore à l'état d'hypothèses (hypothèse du "transporteur membranaire" d'OSTERHOUT (82) qui donna naissance à plusieurs autres hypothèses dont certaines ne sont plus considérées, hypothèse de LING (83) basée sur les forces de Coulomb s'exerçant entre cations hydratés et charges négatives des ions protéiques intraglobulaires). On sait évaluer toutefois les rapports quantitatifs unissant le métabolisme du glucose (source de l'énergie) au transport des cations. Et on peut supposer que les études actuellement en cours et portant en grande partie sur l'activation et l'inhibition du phénomène de transfert actif (SOLOMON (84) (85), GLYNN (86)... contribueront fortement à préciser ces points encore obscurs.

NOTE - Valeur indiquée par ANDERSEN, USSING (67) et confirmée par les valeurs du rapport $(Cl)_i/(Cl)_e$ (équation 2) trouvée par SHAWN (87) sur des globules de cheval, par HARRIS et MAIZELS (88) SOLOMON (89), MARSDEN et coll. (cité par SOLOMON (90)) sur des globules humains etc...

Dans la troisième partie de ce travail, on s'est proposé de montrer que l'exploitation de la méthode expérimentale banale déjà largement utilisée dans les chapitres précédents permet la mise en évidence et la mesure du transfert actif. Les résultats déjà obtenus par GLYNN par l'élégante méthode des isotopes radio-actifs seront pour nous un repère grâce auquel nous pourrons juger si les résultats obtenus sont acceptables.

Si nous nous référons à l'équation (2) on constate toujours par une démonstration indirecte des transports actifs, que ces transports particuliers ne peuvent être mis en évidence que si on peut mesurer, pour un ion considéré, le flux "sortant" (efflux) et le flux"entrant" (influx), la concentration (en réalité l'activité) de l'ion dans les deux milieux extra et intra globulaires et la différence de potentiel existant de part et d'autre de la membrane par la mesure du rapport des chlorures intra et extra globulaires.

Nous avons vu qu'avec une bonne approximation, comme le font la plupart des chercheurs qui ont étudié ce problème, le rapport des coefficients d'activité pouvait être pris égal à un. La différence de potentiel sera mesurée par le rapport des concentrations intra et extra globulaires des ions chlorures, considérés comme se déplaçant passivement, à condition précisément de ne pas modifier ce rapport, ce qui aurait pour effet d'entraîner une variation à la fois de la différence de potentiel et du pH. Pour notre part nous avons conservé le plus souvent possible le plasma comme milieu de suspension, maintenant constante la teneur du milieu extérieur en chlorure et le pH quand on procédait à des modifications pour enrichir le plasma en potassium.

Dès lors, il reste à mesurer les différents flux. Pour cela deux méthodes ont été proposées jusqu'ici. La première fait appel aux isotopes radio-actifs ; elle est sûrement la plus précise et la plus élégante. La seconde, utilisée dans certains cas par GLYNN et USSING, est basée sur une mesure du flux net et de l'influx ou de l'efflux, lui-même mesuré grâce à l'utilisation des isotopes radio-actifs.

Nous avons choisi de réaliser nos mesures de la façon suivante. On mesure sur un même échantillon de sang et pour un ion donné le flux net, le sang étant en "survie" et le flux résultant de tous les mouvements passifs en inhibant la glycolyse par NaF ou ICH_2-CO-NH_2. Ce qui permet donc par différence de connaître le flux qui ne peut se produire qu'en utilisant l'énergie libérée par la glycolyse, contre le gradient de concentration et le gradient électrique (pour le sodium seulement). On peut, en effet, penser qu'en inhibant la glycolyse on interdit au seul transport actif de se manifester tout en laissant à l'ensemble des mouvements ioniques passifs la possibilité de se réaliser puisqu'ils ne sont pas intéressés par la présence de glucose.

Ces mouvements passifs tels que GLYNN les a définis, sont :

Pour le Potassium :

- La partie de l'influx qui n'est pas modifiée par l'absence de glucose et l'efflux.

Pour le Sodium :

- L'efflux qui se produit en absence de potassium dans le milieu extérieur et l'influx.

Mais, en toute rigueur peut-on confondre le flux résultant de tous les mouvements ioniques passifs et le flux que l'on mesure en absence de toute glycolyse.

LOVE et coll (91) et ECKEL (92) ont montré qu'à des concentrations voisines des nôtres, le fluorure de sodium (0,015 M) et le monoiodoacétate (0,001 M) provoquaient une augmentation de la sortie passive du potassium et de l'entrée passive du sodium ; grâce à l'utilisation de traceurs ils ont pu mettre en évidence que cette augmentation dans le cas du potassium n'était pas dûe à un accroissement de l'efflux passif qui demeurait pratiquement inchangé mais à une diminution importante de l'influx (en grande partie actif). De même, dans le cas du sodium où l'accroissement de la pénétration dans les globules est due non à une augmentation de l'influx qui demeure inchangé mais à une diminution de l'efflux.

Pour notre part, nous nous proposons de montrer que le flux actif ainsi mesuré par différence des flux en présence et en l'absence de glycolyse est comparable à celui que mesure GLYNN lorsqu'il fait la différence des flux observés sur des globules incubés dans des milieux contenant ou non du glucose ("extra K influx" - "extra Na efflux"). Il est bien évident que dans l'un et l'autre cas on mesure un certain flux actif (défini par les conditions expérimentales) qui ne saurait représenter nécessairement ou même probablement l'intégralité du flux actif, comme le dit GLYNN lui-même. (Pour plus de commodité on conservera dans le texte l'expression flux passifs pour désigner l'ensemble des flux se produisant en l'absence de glycolyse).

Enfin, pour pousser la vérification plus loin nous étudierons si les transports actifs du K^+ et du Na^+ sont solidaires et de quelle manière, et si les variations de la teneur en K^+ du milieu extérieur influent, comme il a été montré, sur ces mêmes transports.

II - MISE EN EVIDENCE DU TRANSFERT DE L'ION K^+ ET Na^+ CONTRE LE GRADIENT DE CONCENTRATION

En l'absence d'apport énergétique, les mouvements ioniques, dans un système tel que le système globulo-plasmatique, ne peuvent se faire que conformément aux lois de la diffusion c'est-à-dire dans le sens du gradient de concentration.

C'est dire que, pour observer des transferts inverses, (contre le gradient de concentration), il est nécessaire que cet apport énergétique soit réalisé. Il est généralement d'origine métabolique ce qui suppose, pour qu'il puisse se produire que le sang soit dans des conditions permettant le déroulement de réactions productrices d'énergie, c'est-à-dire :

1) Température de $37 \pm 0,1°C$
2) Teneur en glucose suffisante, obtenue en ajoutant 1 à 2 g de glucose par litre de sang

Il ne paraît pas indispensable de maintenir un courant d'oxygène qui ne modifie pas sensiblement les résultats comme nous avons pu le constater et le précisons ci-après. L'oxygénation est délicate à réaliser : un bulle à bulle dans une solution protéique comme le sang, forme une mousse abondante et par là même une hémolyse partielle.

Etant donné les conditions physiologiques habituelles (importante concentration du potassium dans les globules et du sodium dans le plasma) le transfert, contre le gradient de concentration consiste dans une sortie du sodium globulaire (Na_G) et une entrée du potassium plasmatique (K_P).

Les variations de Na_G et de K_P permettent cette étude.

Nous avons étudié parallèlement ces deux phénomènes de la manière suivante.

1) Protocole expérimental

Du sang de cheval recueilli sur héparine est enrichi en glucose (1 à 2 g par litre de sang) et disposé dans un bain-

Marie maintenu à une température constante de 37°C (variation maximum : $\pm$ 0,1°C). Par agitation périodique modérée, on maintient les globules en suspension. A intervalles de temps donnés, on prélève quelques millilitres de sang que l'on centrifuge rapidement pour séparer les globules de leur plasma.

On dose ensuite le potassium plasmatique et le sodium globulaire. Tout au long de l'expérience on note les variations éventuelles de volume globulaire par la méthode hématocrite (microhématocrite).

a) Dosage du potassium

Après déprotéinisation du plasma par l'acide trichloracétique (20 p.100) le potassium est dosé par photométrie de flamme (photomètre LANGE) après dilution appropriée (généralement dilution finale au 1/50).

Ces mesures ont été faites sur au moins 3 prises d'essai d'un même échantillon de plasma.

Connaissant la valeur du volume globulaire par la méthode à l'hématocrite et la concentration du potassium, on en déduit la quantité présente dans le plasma.

b) Dosage du sodium

Pour éviter les erreurs inhérentes aux prélèvements rigoureux de globules, toujours délicats à réaliser, on utilise une méthode en deux étapes, souvent utilisée par les chercheurs pour ce genre de dosage (notamment GLYNN (81)).

On débarrasse tout d'abord les globules de leur plasma interstitiel en les lavant :

- soit 3 fois 3 minutes avec une solution glacée de "Ringer-potassium" (GLYNN)
(KCl ; 146 mM ; $CaCl_2$: 2,2 mM ; $MgCl_2$: 1 mM ; Na_2PO_4H : 2,5 mM; OH_2 qsp 1000)

- soit 2 fois 5 minutes à 2°C avec une solution isotonique de chlorure de choline (POST et JOLLY (93))
(Chlorure de Choline : 151 mM ; $CaCl_2$: 2,2 mM ; Cl_2Mg : 1 mM ; OH_2 qsp 1000)

Un volume déterminé de globules (généralement voisin de 1 ml) est alors lysé par un volume connu d'eau. Sur l'hémolysat globulaire ainsi réalisé on dose le sodium et l'hémoglobine.

Le sodium est dosé, après déprotéinisation, par photométrie de flamme après dilution appropriée : technique identique à celle utilisée pour le dosage du potassium plasmatique (dilution finale : 1/40).

La teneur de l'hémolysat en hémoglobine est déterminée par colorimétrie effectuée sur plusieurs prises d'essai d'un même échantillon d'hémolysat (3 en moyenne). Les détails de la méthode seront donnés ci-après.

On détermine ainsi la concentration du sodium de l'hémolysat en fonction de la quantité d'hémoglobine présente. On convertit ces résultats en concentration par volume de globule en utilisant la densité optique d'une solution préparée par lyse d'un volume très exactement connu de globules avec un volume connu d'eau, servant de témoin.

Comme pour le potassium dans le plasma, on déduit de ces résultats expérimentaux la quantité de sodium présente dans les globules.

Dosage de l'hémoglobine

Les globules utilisés pour préparer la solution témoin d'hémoglobine sont centrifugés à 4000 g durant 1 heure de façon à rendre minimum le volume de plasma piégé qui, dans ces conditions, ne peut être supérieur à 2 p.100 du volume globulaire total, comme nous l'avons vu dans la première partie page 10.

On lyse 1 ml de ces globules par un volume connu d'eau (ici 19 ml) et on établit la courbe de densité optique en fonction du volume globulaire. Pour cela, on mesure la densité optique, au spectrophotomètre UNICAM (λ = 500 mμ), de différentes solutions d'hémoglobine obtenues par dilution de l'hémolysat initial.

La figure 19 montre que la loi de BEER s'applique dans un intervalle de densités optiques compris entre 0 et 1. Nous utilisons dans nos expériences des dilutions au 1/200 correspondant sensiblement à une densité optique de 0,5.

Remarques

L'utilisation de cette méthode pour le dosage du sodium globulaire peut entraîner deux causes d'erreurs :

I. La première concerne l'efficacité du procédé de lavage pour débarrasser les globules, du plasma retenu dans les espaces intercellulaires.

Si le volume de ce plasma "piégé" est de 0,06 ml (3p.100 du volume globulaire pris égal à 2 ml) et le volume du liquide de lavage égal à 3 ml, un lavage diminue 50 fois la quantité de sodium ainsi retenu, 2 lavages la diminuent 2.500 fois, 3 lavages conduisent à diluer 12.500 ce plasma. C'est beaucoup plus qu'il

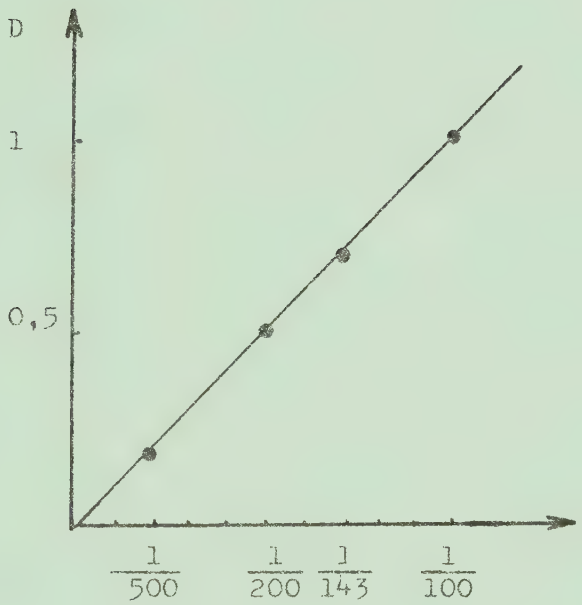


Figure 19 : Vérification de la loi de BEER pour différents hémolysats globulaires.

Nous représentons en abscisse différentes dilutions de 1 ml de globules.

n'en faut pour rendre négligeable le sodium extra-globulaire retenu encore autour des globules après lavage.

II. La seconde est la sortie du sodium intra-globulaire durant le lavage. Nous avons vu (Tableau XVIII) que cette sortie ne peut être négligée si aucune précaution n'est prise. Cependant, en utilisant les solutions de lavage signalées ci-dessus, à température voisine de zéro degré, GLYNN et POST-JOLLY signalent une perte de cations inférieurs à 1 p.100 de la quantité présente dans les globules. Pour notre part, nous avons vérifié dans une expérience parallèle qu'en lavant 3 fois consécutives des globules avec une solution de "Ringer sodium", on ne recueillait que 0,4 p.100 du potassium globulaire (y compris celui provenant du plasma piégé).

2°) Résultats

La figure 20 représente l'allure générale des courbes que l'on obtient lorsque l'on porte les variations du potassium plasmatique ou du sodium globulaire en fonction du temps.

Pour préciser les parties de ces courbes qui paraissent les plus intéressantes (parties comprises entre les abscisses 0 et 10 heures) nous avons étudié ces transferts ioniques sur 3 échantillons de sang différents.

Le tableau XXI et les figures 21 et 22 présentent ces résultats complémentaires. Comme les variations du volume globulaire ne sont jamais supérieures à 1 ou 2 p.100 il ne sera pas fait état dans nos calculs des variations du volume globulaire.

Le rapport $\frac{VG}{VT} = \frac{\text{Vol.glob.}}{\text{Vol.total}}$ est égal à 0,53 pour l'échantillon A.

" " " " " 0,37 " l'échantillon B.

" " " " " 0,40 " l'échantillon C.

Aussi rapporte-t-on tous les résultats au potassium et au sodium pénétrant ou sortant de 1 litre de globules.

Bien que les courbes tracées sur les figures 21 et 22 soient représentatives de mouvements "globaux" (les ions K^+ et Na^+ se déplaçant dans les deux sens), il y a manifestement prédominance durant les 10 premières heures qui suivent le prélèvement, d'un mouvement du potassium plasmatique vers les globules et du sodium globulaire vers le plasma, mouvements qui se réalisent contre les gradients respectifs de concentration. C'est ce qu'indiquent très nettement les figures 21 et 22 où les portions de

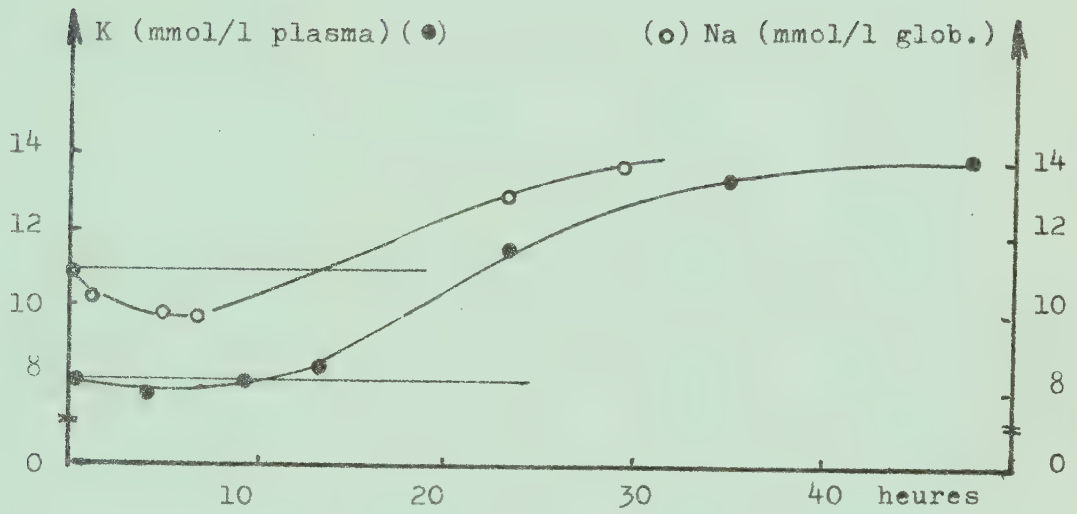


Figure 20 : Variations du taux de Potassium plasmatique et de Sodium globulaire au cours de la conservation du sang (37°C)

courbes situées au dessous de l'axe des abscisses représentent du potassium et du sodium accumulés dans les globules ou le plasma contre le gradient de concentration.

On constate d'autre part (fig.20) qu'à partir de la dixième heure (approximativement), il y a enrichissement du plasma en potassium et des globules en sodium, et cela de façon assez régulièrement progressive. Il y a donc alors une évidente migration du potassium globulaire vers le plasma et du sodium plasmatique vers les globules s'exerçant maintenant dans le même sens que le gradient de concentration, c'est-à-dire correspondant à une banale diffusion à travers la paroi des hématies.

TABLEAU XXI

Echantillon de sang	Temps (heure)	(K) mmol/l plasma	Quantité de K présent dans plasma (mmol/l glob) (x)	Perte ou gain (mmol/l glob.)	(Na) (mmol/l.glob)	Perte ou gain (mmol/l glob)
A	0	6,95	6,2	0		
	1,5	6,70	6	-0,20		
	3	6,80	6,07	-0,13		
	4	7	6,25	+0,05		
	5,75	7,30	6,50	+0,30		
	7	7,6	6,80	0,6		
	8,5	7,7	6,90	0,70		
	10	8,2	7,40	1,20		
B	0	5,45	9,25	0	15	0
	1	5,2	8,80	-0,45	14,70	-0,30
	2	5,2	8,80	-0,45	14,20	-0,80
	3	5	8,55	-0,70	13,70	-1,30
	3,75	4,95	8,40	-0,85	13,60	-1,40
	5	5,20	8,85	-0,40	13,25	-1,75
	6	5,1	8,70	-0,55	13,15	-1,85
	7	5,5	9,35	+0,10	13	-2
	10	5,70	9,70	+0,45	12,90	-2,10
C	0	5,90	8,85	0	10	0
	1	5,7	8,55	-0,30	9,8	-0,20
	2,25	5,65	8,45	-0,40	9,20	-0,80
	3,25	5,75	8,60	-0,25	8,85	-1,15
	4,75	5,9	8,85	0	9,10	-0,90
	6	6,25	9,40	0,55	9,40	-0,60
	7,75	6,85	10,25	1,40	9,55	-0,45
	9,50	7,2	10,80	1,95	9,65	-0,35

(x) Ceci est exprimé en mmole de K présentes dans le volume de plasma correspondant à un volume globulaire de 1000 ml.

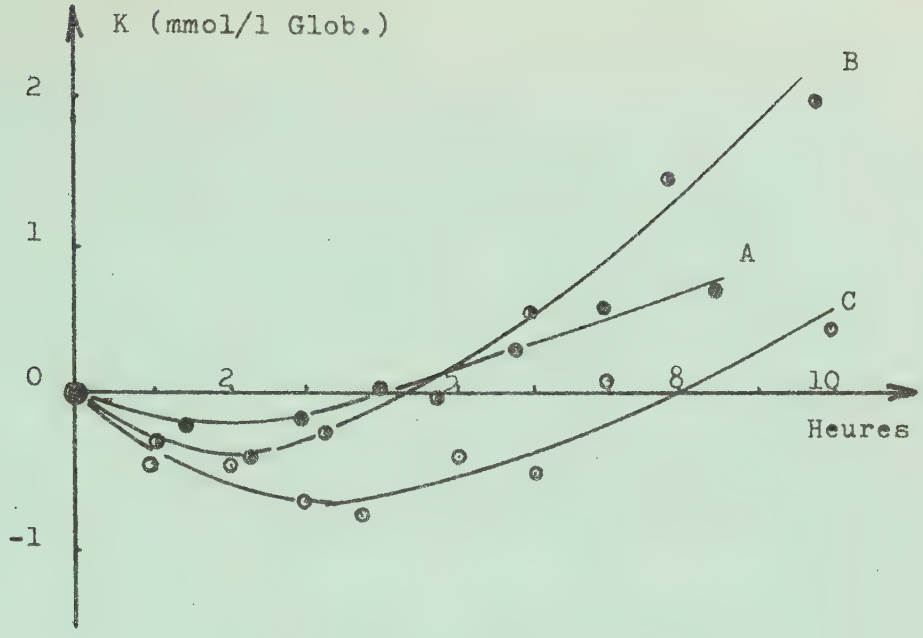


Figure 21 : Variations du taux de Potassium plasmatique au cours de la conservation du sang (37°C).

Résultats exprimés en mmole de K se trouvant dans un volume de plasma correspondant à 1000 ml de globules.Expression que nous écrirons dorénavant mmol K / l Glob.

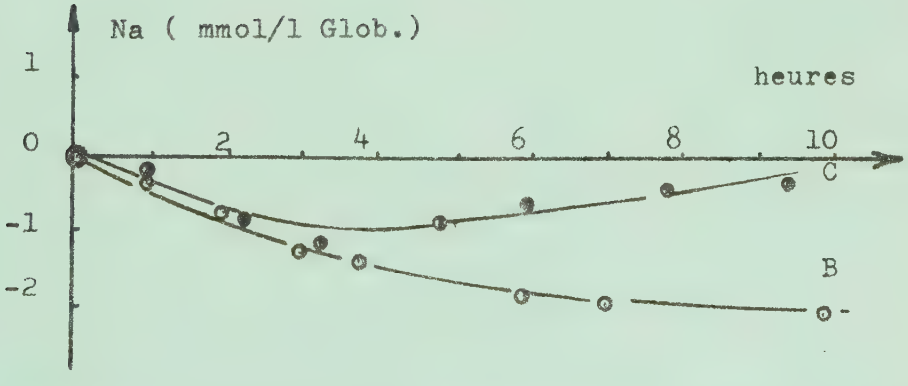


Figure 22 : Variations correspondantes du taux de Sodium globulaire

Résultats exprimés en mmol/l Glob.

3) Discussion

Le point qu'il convient de souligner dans l'expérimentation précédente est la pénétration intra-globulaire de K^+ démontrée par la diminution du K^+ plasmatique au début de l'incubation.

Cette pénétration "in vitro" a d'ailleurs été montrée par de nombreux auteurs, DANOSKI (76) HOUTSMULLER (94) à divers points de vue. C'est ainsi que SCHATZMANN (95) CRASTES DE PAULET et coll. (96) ont mis en évidence l'effet inhibiteur du k-strophantoside sur la pénétration globulaire du K. Ces derniers auteurs ont en particulier précisé que "l'aire d'hypokaliémie" permet indirectement d'explorer la circulation des glucosides cardiotoniques.

III - INHIBITION DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES GLOBULES ROUGES. EFFETS SUR LE TRANSFERT DES IONS K^+ ET Na^+. MESURE DES FLUX ACTIFS.

La démonstration du rapport étroit entre le transport du potassium et du sodium et le métabolisme dans les érythrocytes n'est plus à faire. La glycolyse est indispensable pour maintenir la répartition inégale des ions entre globules et plasma.

Si on inhibe cette glycolyse par un agent chimique (NaF, $ICH_2 - CONH_2$) ou simplement par stockage à 0°C, il est possible de mesurer d'une façon globale l'ensemble des transferts ne nécessitant pas une énergie extérieure et d'en déduire, par conséquent des flux actifs, comme il a été précisé pages 74 .. 75

1) Etude comparative des transferts globulo-plasmatique de K^+ selon le mode d'inhibition enzymatique

La première question à régler est en effet de pouvoir comparer les échanges ioniques (K^+ par exemple) d'une part, en présence d'inhibiteurs de glycolyse, d'autre part après vieillissement du sang dont l'activité métabolique se trouve alors pratiquement annulée.

Pour cela, on ajoute au sang soit du fluorure de sodium ($1{,}6.10^{-2}$ mole/l) soit de l'iodoacétamide (10^{-3} mole/l) (x). Un troisième échantillon de même sang est conservé, les globules ayant été séparés de leur plasma. Au bout de 24 heures le sang est reconstitué ; cette opération a pour but d'empêcher des phénomènes de transferts ioniques au cours de la conservation.

On suit alors à 37°C en fonction du temps, les variations du potassium plasmatique que l'on dose après déprotéinisation du plasma et dilution appropriée du filtrat trichloracétique au photomètre à flamme.

Le tableau XXII et la figure 23 présentent ces résultats.

(x) Concentrations utilisées par GARDOS (97)

TABLEAU XXII

Effets de divers inhibiteurs sur le transfert globulo-plasmatique de K^+

Inhibiteur	NaF ($1,6\ 10^{-2}$ M/l)			ICH_2CONH_2 (10^{-3} M/l)	
Heures	mmole/l plasma	$\frac{V_P}{V_G}$	mmol/l glob.(x)	mmole/l plasma	mmole/l glob. (x)
0	6,15	1,04	6,40	6,15	6,40
4	8,10	"	8,40	8,30	8,60
8,5	9,75	"	10,15	10	10,5
13	13,10	"	13,60	13,70	14,25
30	12,80	"	13,30	13,80	14,35
47	14,10	"	14,65		

Inhibiteur	Vieillissement du sang		
Heures	mmole/l plasma	$\frac{V_P}{V_G}$	mmole/l glob. (x)
0	6,15	1,09	6,7
5	7,05	"	7,70
8	10,55	"	11,50
22,5	12	"	13,10
29	12,80	"	13,95

Les résultats reproduits sur la figure 23 montrent qu'il y a immédiatement et progressivement enrichissement du plasma en potassium.

Les résultats ainsi obtenus, en inhibant la glycolyse avec NaF au ICH_2CONH_2 sont sensiblement équivalents. Il semblerait qu'un léger décalage puisse être décelé, au moins durant

(x) Il s'agit ici aussi de mmoles de potassium par volume de plasma correspondant à 1000 ml de globules.

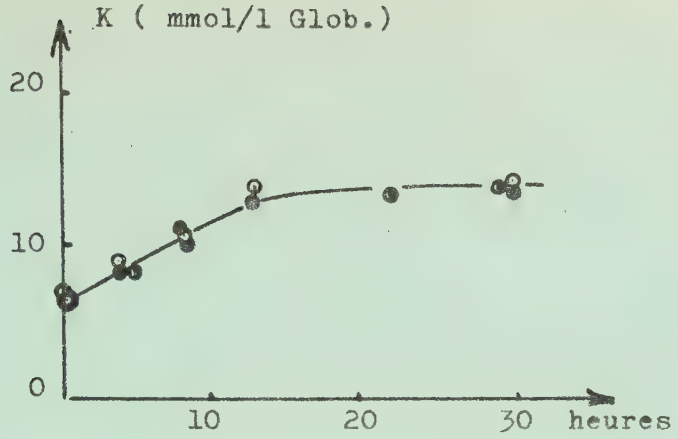


Figure 23 : Action de différents modes d'inhibition sur la teneur du plasma en Potassium, exprimée en mmol K /l Glob.

- ⊙ Inhibiteur : ICH_2CONH_2 (10^{-3} mol/l)
- ● Inhibiteur : NaF (1,6 10^{-2} mol/l)
- ◉ Inhibition par vieillissement du sang.

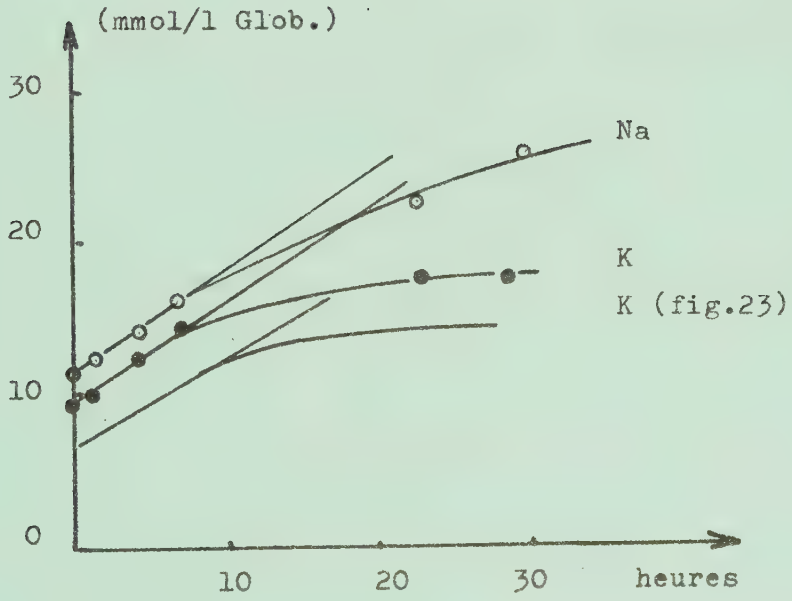


Figure 24 : Action inhibitrice du NaF sur la teneur en Potassium plasmatique et en Sodium globulaire d'un même échantillon de sang.

La courbe inferieure est celle obtenue sur la figure 23.

les premières heures de certaines expériences, si la suppression métabolique est obtenue par vieillissement du sang. Peut-être ce fait est-il explicable par un "reste métabolique" permettant - ne serait-ce que faiblement - l'existence de transfert ionique actif.

2) Mesure des transferts passifs par inhibition de la glycolyse

Les courbes d' "sang inhibé" peuvent donc être considérées comme représentant l'ensemble des phénomènes de transferts passifs. Autrement dit, ces courbes représentent l'ensemble global du mouvement des ions K^+ ou Na^+ qui se produisent autrement que par l'apport énergétique de la glycolyse par influence des gradients de concentration et de potentiel électrochimique en particulier. Or, comme nous le savons depuis les travaux de HARRIS (39), GLYNN (81), SHAW (87), ces transferts passifs pour chaque ion K^+ ou Na^+ peuvent s'effectuer dans les deux sens (globules⟶ plasma ; plasma ⟶ globules).

Outre les précédentes mesures (fig.23) on a mesuré ces transferts de K^+ et de Na^+ sur un même échantillon de sang additionné de fluorure de sodium, en suivant simultanément les variations du potassium plasmatique et du sodium globulaire.

Le tableau XXIII et la figure 24 présentent les résultats obtenus. Sur cette dernière est reproduite, pour référence, la courbe moyenne obtenue durant les premières heures à partir des résultats de la figure 23.

TABLEAU XXIII

Variations du potassium plasmatique et du sodium globulaire d'un sang "inhibé" par NaF ($1{,}6\ 10^{-2}$ mole/l). Résultats exprimés en mmole par litre de globules pour le sodium et en mmole par volume de plasma correspondant à 1000 ml de globules pour le potassium.

Heures	(K) (mmole/l de plasma)	(K) $\frac{V_P}{V_G}$ (mmole/l glob.)	Na (mmole/l glob.)
0	6,20	9,95	11,50
1,25	6,40	10,25	12,60
4,5	7,85	12,55	14,45
7	9,15	14,65	16,30
23	10,80	17,30	23,60
28,5	10,50	17,00	25,80

Outre l'enrichissement du plasma en potassium qui apparaît dès le début de l'expérience et va en augmentant progressivement, apparaît ici un enrichissement parallèle des globules en sodium. De plus, il ressort de ces différentes expériences d'inhibition et de la figure 25 que les transferts passifs globaux, lorsque le milieu extra-globulaire est du plasma, peuvent être considérés comme évoluant sensiblement de la même manière en fonction du temps, puisqu'au moins au début, ils sont convenablement représentés par des droites parallèles (x).

On calcule ainsi graphiquement à partir de points expérimentaux que la pente de ces droites est sensiblement constante et égale à 0,51 (mmole/l glob/heure).

3) Conséquences

I. Si on exprime les résultats obtenus dans le chapitre précédent (mouvements globaux du potassium et du sodium) en quantité d'ions traversant une surface donnée par unité de temps (mmoles/litre de globules/heure), c'est-à-dire en unité de flux, il est alors possible de définir, compte tenu des résultats précédents, une nouvelle grandeur : un flux ionique dirigé contre un gradient de concentration et ne pouvant s'effectuer qu'en présence de glucose. (Extra K influx au Extra Na efflux de GLYNN).

En d'autres termes, il est possible de calculer à partir des résultats précédents ce qu'on appelle un "flux actif".

En effet, connaissant le mouvement global du potassium dans le plasma (flux "net") et le mouvement global passif de ce même ion en absence de toute glycolyse (flux "net passif") il est possible de calculer le flux qui ne se produira qu'en présence du glucose et donc actif.

Il en serait de même pour calculer le flux actif du sodium.

A partir des figures 21, 23 on peut calculer le flux net maximum de K^+ et de Na^+ ; pente de la tangente à l'origine de la courbe tracée en prenant la moyenne des valeurs obtenues dans nos différentes expériences. Ces flux seront précédés du signe moins ou plus, suivant qu'ils seront dirigés des globules vers le plasma ou inversement.

(x) Ces droites ne sont pas confondues à cause des légères différences existant entre les concentrations du potassium plasmatique et du sodium globulaire des divers échantillons de sang étudiés. Le rôle de la concentration extérieure en K^+ sera ultérieurement étudié mais ne saurait intervenir d'une manière décisive ici.

Flux net du potassium : + 0,28 mmoles/l glob/h
" " sodium : - 0,3 mmoles/l glob/h

En retranchant algébriquement le flux passif du flux net on obtient :

Flux actif du K = + 0,28 + 0,51 = + 0,79 mmol/l glob/h
Flux actif du Na = - 0,30 - 0,51 = - 0,81 mmol/l glob/h

Sachant que la valeur moyenne de la teneur en K^+ plasmatique de nos échantillons de sang était de 7 mmoles/l, on retrouve à quelque chose près la valeur de l'extra flux de GLYNN pour la même valeur du taux initial de K^+.

Flux actif du K = + 0,7, + 0,8 mmol/l glob/h
Flux actif du Na = - 0,65 mmol/l glob/h

II. Conséquence qui découle de la précédente et que GLYNN avait énoncée :

Les transferts actifs du sodium et du potassium se font par échange de 1 particule de sodium pour 1 particule de potassium, ce qui inciterait à préférer la notion de "Pompe à sodium" à toute autre pour expliquer la nature de tels transports actifs.

Appendice I -

La localisation globulaire des transferts "actifs" peut être concrétisée par des expériences de "sangs croisés".

On considère les systèmes suivants :

1) Sang frais
2) Mélange de globules frais et de plasma vieilli
3) Mélange de globules vieillis et de plasma frais

Dans les trois cas, on enrichit en glucose et potassium (x) selon la technique indiquée.

Les résultats obtenus montrent que la baisse initiale de la teneur en potassium du plasma n'est obtenue que si les globules sont frais (quel que soit d'ailleurs le plasma : frais ou vieilli).

Avec des globules vieillis, même si le plasma est frais, les résultats sont identiques à ceux obtenus avec du sang total vieilli ou additionné d'inhibiteur.

(x) Les conditions de volume sont les suivantes : 5 ml de sang total et remplacement de 0,5 de plasma par 0,5 ml de solution iso-osmotique de KCl et de glucose.

Appendice II -

Nous avons signalé page 76 que les expériences destinées à mesurer le phénomène de transport actif ont été faites sans oxygénation du sang.

Voici quelques données numériques comparatives qui justifient cette simplification : les variations du taux du potassium plasmatique sont du même ordre, que le sang soit maintenu à 37° et glucosé sans oxygénation ou avec oxygénation.

Le tableau ci-dessous présente le résultat obtenu sur des échantillons de sang enrichi en potassium (volume globulaire de départ 44 p.100 du volume du sang total).

TABLEAU XXIV

Heures	Sang non oxygéné			Sang oxygéné	
	(K) (mmol/l)	$\frac{V_P}{V_G}$	(K) (mmol/l glob)	(K) (mmol/l)	(K) (mmol/l glob)
0	32,3	1,27	41	32,3	41
2	30,2	"	38,35	30,7	39
4,5	31	"	39,35	30,5	38,7
7	32	"	40,65	31,2	39,6
14	32,3	"	41	33,8	42,9

Le plasma utilisé est certes enrichi en potassium mais ces résultats nous permettent de conclure, comme le firent de nombreux auteurs (79) (89) (97) (98), que les transports de sodium et de potassium ne sont pas affectés par la composition en oxygène du milieu où les globules rouges sont en suspension.

Ceci nous permet de rattacher d'une autre manière les transports actifs à la glycolyse anaérobie, ce que confirme d'ailleurs après les travaux de WILBRANDT (100) ECKEL (92) LOVE et coll. (91) nos résultats précédents sur les effets des inhibiteurs métaboliques.

IV - EFFETS DE LA VARIATION DU GRADIENT DE CONCENTRATION SUR LE MOUVEMENT PASSIF ET ACTIF DES IONS K^+ ET Na^+

Le rôle de la concentration extérieure du potassium sur les mouvements nets, passifs et actifs des ions K^+ et Na^+ est maintenant connu avec assez de précision ; aussi a-t-on cherché dans ce chapitre à vérifier si la mesure des flux actifs telle qu'elle est indiquée dans les pages qui précèdent peut rendre compte des résultats obtenus par d'autres méthodes, en particulier celle utilisant les indicateurs marqués (GLYNN, SHAW).

Le fait de surcharger le plasma en potassium modifie à la fois le gradient de concentration de cet ion et par contre coup celui de l'ion Na^+ (x) puisque une certaine quantité de plasma (donc de NaCl en grande partie) est remplacée par du KCl isotonique. Par conséquent, cette modification doit nécessairement influer sur le mouvement passif de ces ions.

Il est à remarquer cependant que l'étude de ce phénomène ne devrait se faire que dans un intervalle de concentration en potassium assez restreint si l'on ne veut pas modifier d'une manière appréciable la composition du plasma et par contre coup la différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane.

Sachant d'autre part (GLYNN) (81) que le flux actif de l'ion K^+ et de l'ion Na^+ sont stationnaires au-delà d'une concentration en potassium de 10 mmole/l de plasma, nous avons étudié ces transferts pour l'intervalle de concentration suivant :

$$5 \text{ mmoles/l} < (K) < 12 \text{ mmoles/l}$$

c'est-à-dire pour du sang normal et du sang dont le plasma était enrichi en potassium. Un échantillon de sang sera cependant étudié pour une concentration en potassium voisine de 30 mmole/l pour vérifier que dans ces conditions le flux actif n'augmente pas notablement.

(x) Etant donné la concentration du sodium dans le plasma, cette variation peut être considérée comme pratiquement négligeable.

1°) Technique utilisée

On ajoute du glucose (1 g/l) à du sang de cheval fraîchement recueilli sur héparine. Une partie de ce sang sert de témoin, l'autre est enrichie en potassium. Pour cela, un volume de plasma est très exactement remplaçé par un égal volume de solution isotonique de KCl de façon à réaliser une concentration plasmatique du potassium voisine de 10 mmoles/l ou de 30 mmoles/l. Dans nos expériences, compte tenu du volume globulaire = 40 p.100 ce volume était égal à 2 ml ou à 10 ml pour 60 ml de plasma (2 ou 10 pour 100 de sang).

On place les 2 lots de sang au bain Marie à 37°C. On suit alors les variations du potassium plasmatique et du sodium globulaire en fonction du temps.

Dans une seconde série d'expériences on effectue l'étude de ces mêmes variations sur du sang également enrichi en potassium mais contenant du fluorure de sodium, destiné à inhiber les transferts actifs. Les dosages du potassium et du sodium se font comme décrit précédemment.

2°) Résultats

Les résultats obtenus au cours de ces expériences sont résumés dans les tableaux XXV, XXVI, XXVII et figures 25, 26, 27 suivants :

TABLEAU XXV

Sang "inhibé" : Variations du potassium plasmatique (mouvement passif global)

$(K)_o$ = 11,25 mmoles/l			$(K)_o$ = 30,5 mmoles/l		
Heures	(K)mmole/l plasma	(K)mmole/l glob.	Heures	(K)mmol/l plasma	(K)mmole/l glob.
0	11,25	16,8	0	30,5	47,60
1	11,5	17,25	2	31	48,40
2	11,7	17,55	6	32	49,9
4	12,1	18,15	15	34	53,5

TABLEAU XXVI

Sang non "Inhibé" : Variations du potassium plasmatique (mouvement net) (x)

$(K)_o$ = 11,25 mmol/l				$(K)_o$ = 32 mmol/l			
Heures	(K) mmol/l plasma	(K) mmol/l glob.	Varia. de K ds plasma (mmol/l glob)	Heures	(K) mmol/l plasma	(K) mmol/l glob	Varia. de K ds plasma (mmol/l glob)
0	11,25	16,9	0	0	32	49,9	0
1	10,9	16,35	-0,55	2	31,2	48,67	-1,23
2,25	10,5	15,75	-1,10	7	32	49,9	0
3,25	10,90	16,35	-0,55	16	41	63,9	+1,3
4,75	11	16,50	-0,40				
6	10,85	16,30	-0,60				
7,75	11	16,50	-0,40				
9,30	11,35	17	+0,10				

TABLEAU XXVII

Sang non "Inhibé" : Variations du sodium globulaire (mouvement net) (x)

Heures	(Na)mmol/l glob;	Variations du sodium globulaire (mmol/l glob)
0	10,20	0
1	9,60	-0,6
2,25	9,10	-1,10
3,25	8,50	-1,70
4,75	8,85	-1,35
6	8,50	-1,70
7,75	8,60	-1,60
9,70	8,80	-1,40

(x) Les résultats obtenus sur le témoin sont consignés dans le tableau XXI.

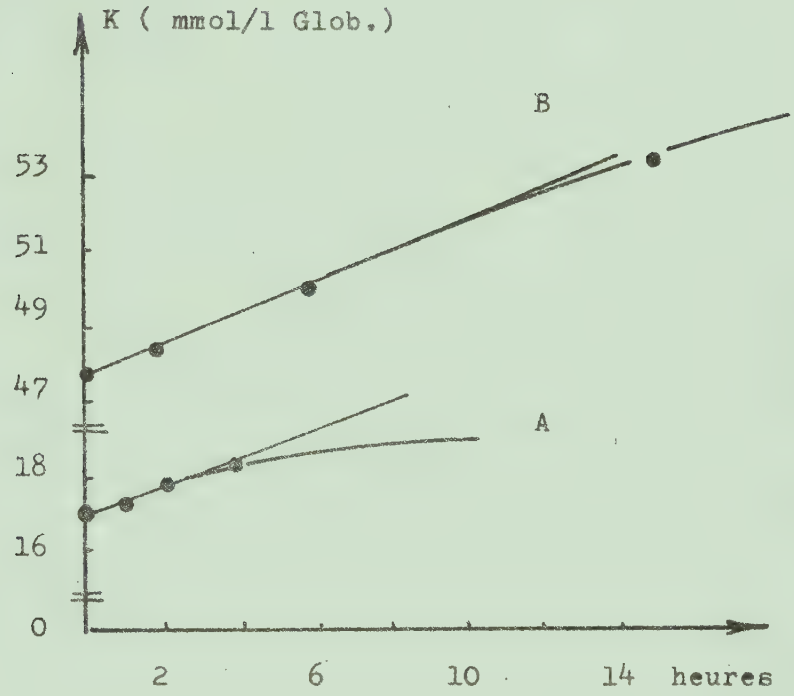


Figure 25 : Variations du Potassium plasmatique aprés enrichissement du sang en Potassium et inhibition de la glycolyse par NaF.

Courbe A : $(K)_o$ = 11,25 mmol/l Plasma
Courbe B : $(K)_o$ = 30,50 mmol/l Plasma.

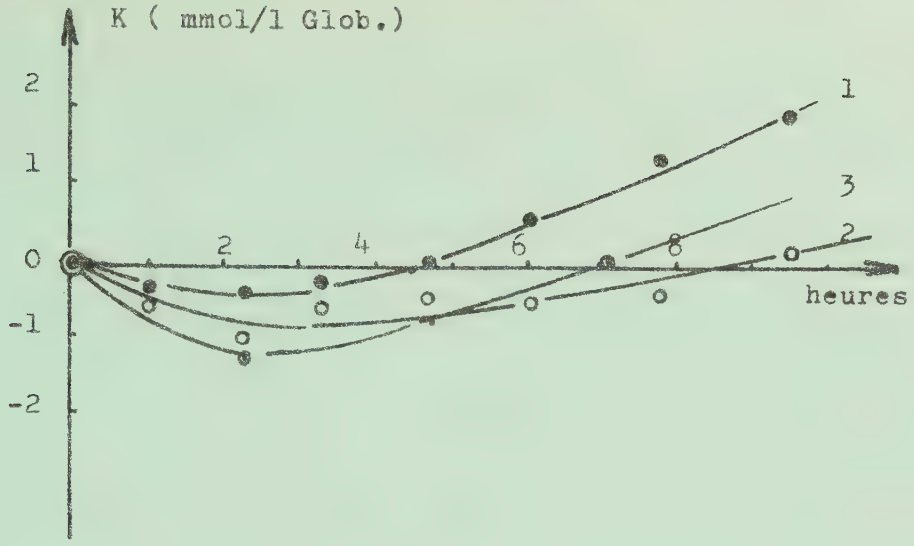


Figure 26 : Variations en fonction du temps du Potassium plasmatique de 3 échantillons de sang différemment enrichis en Potassium.

Courbe 1 : sang témoin $(K)_o$ = 5,9 mmol/l Plasma
Courbe 2 : sang enrichi $(K)_o$ =11,25 " "
Courbe 3 : sang enrichi $(K)_o$ =32 mmol/l Plasma.

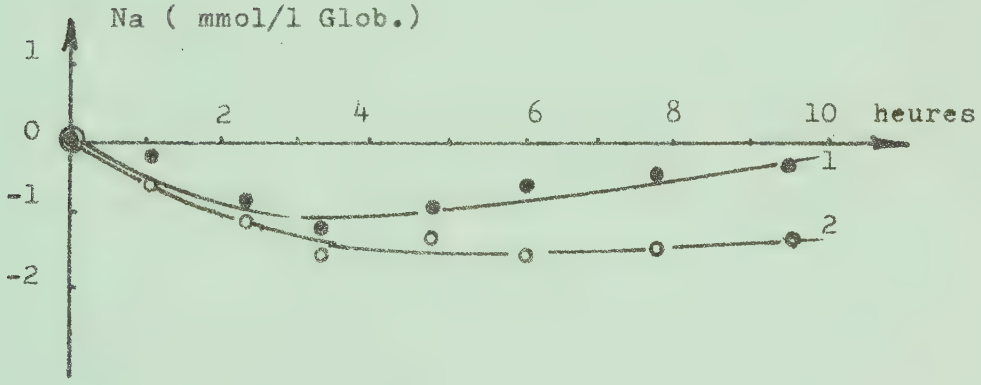


Figure 27 : Variations en fonction du temps du Sodium globulaire d'échantillon de sang enrichi en Potassium.

Courbe 1 : sang témoin $(K)_o$ = 5,9 mmol/l Plasma
Courbe 2 : sang enrichi $(K)_o$ = 11,25 " "

A partir de ces différentes figures, il est possible de calculer graphiquement le flux net et la résultante des différents flux passifs en prenant la pente de la tangente à l'origine des courbes ainsi représentées (flux maxima).

Nous résumons les résultats obtenus dans l'ensemble de nos expériences dans le tableau suivant où sont indiqués, pour chaque échantillon de sang utilisé, la concentration initiale en potassium et les valeurs des différents flux des ions K^+ et Na^+.

TABLEAU XXVIII

Echantillon		B	C	A	D	E
$(K)^{t=o}$ plasma (mmol/l)		5,45	5,90	6,95	11,25	82
Flux passifs globaux (mmol/l glob/h)	K	-0,51	-0,51	-0,51	-0,39	-0,38
	Na	0,51	0,51	0,51	0,39	
Flux nets (mmol/l glob/h)	K	0,3	0,3	0,25	0,51	0,61
	Na	-0,3	-0,3		-0,54	
Flux actifs (mmol/l glob/h)	K	0,81	0,81	0,76	0,90	0,99
	Na	-0,81	-0,81		-0,93	

Ces résultats expérimentaux ne sont pas suffisants pour construire la courbe : "Flux actif" - Concentration extraglobulaire en potassium ; on constate cependant qu'ils ne sont pas éloignés de ceux de GLYNN et SHAW, compris même entre les limites extrêmes de l'erreur expérimentale reconnue par ces auteurs.

On vérifie aussi, que le flux "net" du potassium comme celui du sodium vont dans le sens d'une accumulation accrue de ces ions respectivement dans les globules et dans le plasma lorsque $(K)_o$ augmente, ce qu'avait déjà montré GLYNN.

L'affaiblissement des flux passifs globaux était également attendu, et bien que la technique utilisée ne nous permette pas de connaître le détail des différents flux constitutifs, il est permis de supposer que le flux suivant les gradients de concentration seront affaiblis.

A N N E X E

Rôle éventuel joué par l'anion associé au cation qui participe au transport actif

Nous avons vu dans la première partie de ce travail que le comportement osmométrique des hématies, dans des solutions d'électrolytes peut dépendre de l'anion (pour un cation donné). On a, en particulier, montré que des hématies placées dans des solutions iso-osmotiques de KCl, KBr, KNO_3, KCO_3H, KCH_3CO_2, KPO_4H_2, K_2SO_4, ne présentent pas le même comportement ; ce qui se traduit par des variations parfois importantes du volume globulaire : augmentation pour les phosphates, diminution pour les nitrates, bicarbonates, acétates et sulfates, aucune variation pour les chlorures et bromures.

Nous avons, de plus, dans le cas particulier des sulfates vérifié que la pénétration de cet anion ne pouvait se faire que par échange avec des ions monovalents tels que Cl^- ou CO_3H^- de manière que l'équilibre électrique du système soit maintenu.

On sait d'autre part le rôle que joue dans la diffusion des ions la nature de l'anion (séries d'HOFMEISTER).

Dès lors, on peut se demander, à la suite des résultats précédents, portant sur les variations du transport actif en fonction de la concentration extérieure en potassium, si la nature de l'anion introduit en même temps que l'ion K^+ (pour enrichir le milieu de suspension en potassium) est susceptible d'intervenir. Car, s'il est bien admis que le transfert actif du potassium et du sodium se fait par échange entre ces 2 ions, on peut se demander quel serait l'effet du remplacement d'une partie des chlorures plasmatiques par d'autres anions organiques ou inorganiques de poids atomique de plus en plus élevé. Une telle expérimentation peut modifier le potentiel de membrane et par contre coup les flux passifs qui varient en fonction du gradient de potentiel électrique. Il se peut donc que les flux nets eux-mêmes soient affectés.

Pour cette raison on se limitera, dans les expériences qui suivent, à une étude relative des phénomènes observés en comparant entre eux les résultats pour déceler, si cela est possible, une différence de flux qui pourrait être le signe d'une sélectivité particulière de la membrane.

- Technique utilisée et résultats

Cette étude est réalisée suivant la technique présentée dans le chapitre précédent. On remplace seulement la solution de chlorure généralement utilisée par des solutions isoosmotiques de bicarbonate, acétate, et tartrate double de sodium et potassium.

On opère de telle façon que la concentration extérieure en potassium au temps zéro soit assez voisine d'un échantillon à l'autre pour éliminer le rôle non négligeable de la concentration sur les flux, comme nous l'avons montré.

Les concentrations initiales en potassium, utilisées dans cette expérience sont les suivantes :

Anion considéré	$(K)_o$ (mmol/l glob)
Cl^-	46,35
CO_3H^-	43,94
$CH_3CO_2^-$	43,43
$NaOOC\ (CHOH)_2COO^-$	45,40

Dans ces conditions, les résultats que l'on obtient en suivant, dans le temps, les variations du potassium extraglobulaire de chacun des 4 échantillons, enrichis en potassium avec ou sans inhibiteur, permettent de tracer deux séries de courbes correspondant aux transports ioniques "nets" et aux transports passifs globaux de cet ion en absence de glycolyse.

La figure 28 présente l'allure générale des phénomènes observés où les crochets indiquent les valeurs extrêmes obtenues en dosant le potassium dans les 4 échantillons au même instant. (Il paraît superflu de détailler chacune des courbes, l'ensemble se présentant plutôt comme un faisceau de courbes enchevétrées).

On constate ainsi :

1°) La perte de potassium par les globules, dans les expériences d'inhibitions est la même quelque soit l'anion asso-

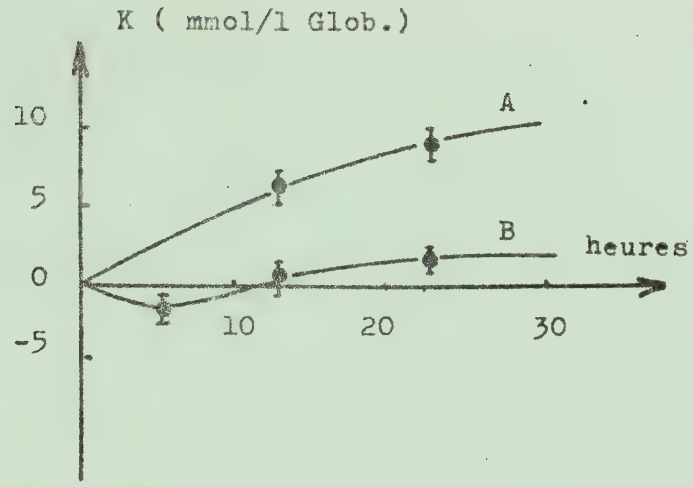


Figure 28 : Variations du taux de Potassium plasmatique d'un même échantillon de sang enrichi en ions K^+ associés à différents anions.

Courbe A : Sang dont la glycolyse n'a pas été inhibée.
Courbe B : Sang dont la glycolyse a été inhibée par NaF.

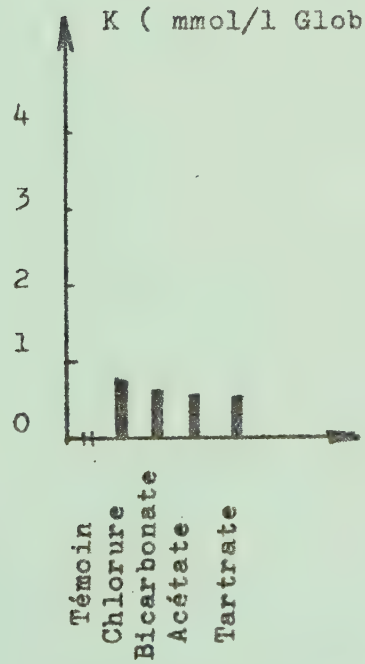


Figure 29

Flux actif du Potassium (influx)
(Pour le détail de la technique utilisée se référer au texte)

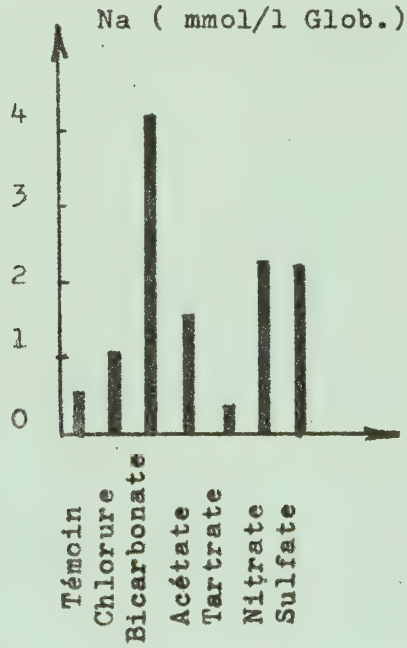


Figure 30

Flux passif du Sodium (Influx)

-cié au potassium plasmatique. Ceci peut se concevoir puisque les volumes plasmatiques étant identiques dans toutes les expériences et les concentrations en potassium de part et d'autre de la membrane globulaire sensiblement les mêmes, on peut attendre un phénomène passif global assez reproductible bien qu'il y ait toujours lieu de considérer, en principe, l'influence de la diffusion de l'anion (chlorure, bicarbonate, acétate ou tartrate) vers les globules ; influence qui demeure dans ce cas très minime.

De même, on ne considère pas l'effet osmotique que pourrait provoquer ces différents électrolytes car aux concentrations où ils sont utilisés ils ne produisent que des rétractions globulaires de l'ordre de 1 à 2 p.100.

2°) Il paraît assez difficile aussi de dissocier les courbes représentatives du transport net de l'ion K^+ en fonction du temps. Dans ces conditions, il semble que pour une concentration extra-globulaire en potassium identique dans ces 4 cas, l'anion introduit avec le potassium dans le liquide extra-globulaire n'a aucune influence prépondérante sur le transport actif.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons cherché à comparer le flux passif du sodium et actif du potassium selon l'anion associé au cation, ce qui permet, dans des conditions de concentration pratiquement identiques, d'étudier le comportement de la membrane globulaire dans le même sens.

- La pénétration active du potassium est étudiée après remplacement d'une partie du plasma par des solutions iso-osmotiques (x) de KCl, KCO_3H, $KOOC.CH_3$, $KOOC-(CHOH)_2-COONa$.

- La pénétration passive du sodium est étudiée après vieillissement du sang et remplacement du plasma par un mélange (x) de chlorure de choline et d'un sel de sodium (NaCl, $NaOOC-CH_3$, $NaOOC-(HOH)_2-COOK$, $NaNO_3$, Na_2SO_4).

Dans tous les cas, on a, au temps zéro, la même concentration en potassium ou sodium dans le milieu extra-globulaire. Après 3 à 5 heures de contact, on dose le potassium plasmatique et le sodium globulaire, par les techniques déjà indiquées.

(x) Les concentrations sont telles que la pénétration active de potassium est réalisée dans des conditions voisines de l'état physiologique. Quant au sodium, il a été pris à la même concentration extérieure que le potassium.

Voici résumés dans les deux tableaux qui suivent les résultats obtenus :

TABLEAU XXIX

Pénétration du potassium plasmatique dans les globules (mouvement net)

Nature de l'anion	Heure	(K) (mmole/l plasma)	(K) (mmole/l glob)	Δ (K) Perte par le plasma
Sang témoin	0 3	6,64 6,64	8,83 8,83	0
Cl^-	0 3	20,7 20,2	27,53 26,80	- 0,73
CO_3H^-	0 3	21,3 20,9	28,32 27,70	- 0,62
CH_3COO^-	0 3	19,4 19	25,80 25,27	- 0,53
$NaOOC-(CHOH)_2-COO^-$	0 3	20,89 20,56	27,8 27,26	- 0,54

TABLEAU XXX

Pénétration du sodium dans les globules (contenu global au temps : t)

Nature de l'anion	$(Na)_o$ (mmole/l glob)	$(Na)_{t=3h}$ (mmole/l glob)	(Na) Gain des globules (mmole/l glob)
Sang témoin	9,91	10,43	+ 0,52
Cl^-	9,47	10,43	0,96
CO_3H^-	10,17	14,26	4,09
$CH_3CO_2^-$	9,21	10,78	1,57
$KOOC(CHOH)_2COO^-$	8,86	9,13	0,27
NO_3^-	9,34	11,47	2,13
$SO_4^=$	9,65	11,65	2

Ces résultats sont encore plus nets sur les figures 29 et 30 suivantes où nous avons représenté la quantité de potassium ou de sodium ayant pénétré dans les globules, durant un même temps, par une colonne dont la hauteur est proportionnelle à cette pénétration.

Le transfert net de potassium ne paraît donc pas dépendre de la nature du sel de potassium ajouté au plasma (Fig. 29).

Par contre, la diffusion passive du sodium vers les globules dépend de la nature de l'électrolyte.

V - REMARQUES GÉNÉRALES CONCERNANT L'ETUDE DES TRANSFERTS ACTIFS GLOBULO-PLASMATIQUES

I. - Lorsque du sang, récemment prélevé, enrichi en glucose est maintenu à 37°, on constate que :

a) les taux de potassium plasmatique et de sodium globulaire diminuent pendant les 2 ou 3 premières heures ou restent en dessous des valeurs de départ pendant les 10 premières heures, légèrement mais indiscutablement.

b) au delà de ce temps, les taux de potassium plasmatique et de sodium globulaire augmentent rapidement.

Ces mouvements sont des échanges globaux auxquels participent nécessairement le phénomène de diffusion et le transfert dit actif, conséquence du métabolisme énergétique de l'hématie.

II. - Le transfert actif peut être éliminé soit par addition au sang d'un inhibiteur enzymatique (fluorure de sodium, iodacétamide) ou par vieillissement du sang. Il en résulte que, par comparaison des échanges globaux, comme indiqués ci-dessus, et des échanges observés après inhibition, l'évaluation quantitative du flux actif seul est possible.

Celui-ci a été mesuré, aussi bien pour le sodium que pour le potassium en calculant les pentes des courbes de cinétique de transfert.

III. - Si l'on surcharge le sang en potassium, on observe une augmentation des flux globaux de K^+ et Na^+, les flux passifs ne semblant pas sensiblement modifiés. Ceci peut s'expliquer, dans les conditions expérimentales adoptées car, malgré la surcharge plasmatique, le déséquilibre de concentration globulo-plasmatique n'est pas très modifié.

On peut ainsi, par le calcul, montrer que les flux actifs aussi bien de sodium que de potassium sont augmentés

par rapport au sang non surchargé.

La liaison des transferts actifs est ainsi explicitée puisque le flux actif de Na^+ non directement influencé par la concentration de cet ion demeurée constante, varie néanmoins dans le même sens que celui de K^+.

IV. - A titre accessoire, on notera enfin deux points particuliers :

a) On vérifie, par des expériences de sang croisé, que c'est bien les globules - et eux seuls - qui interviennent dans les transferts actifs.

b) Les flux actifs de K^+ (vers les globules) sont les mêmes avec divers sels de K^+, alors que les flux passifs de Na^+ (vers les globules également) sont très différents selon l'électrolyte utilisé.

CONCLUSION

On a tenté, dans ce travail, une analyse de trois mécanismes intervenant dans les échanges globulo-plasmatiques en s'efforçant de préciser les conditions dans lesquelles l'un d'entre eux est prépondérant.

I. - En toute rigueur, le globule rouge n'est pas un osmomètre car la paroi globulaire n'est pas semi-perméable (c'est-à-dire uniquement perméable à l'eau). Néanmoins, si les hématies sont placées dans des solutions de substances peu ou lentement diffusibles et si le déséquilibre d'osmolarité entre milieu extérieur et milieu intérieur est élevé, les transferts de solvant sont prépondérants au point de masquer tout autre phénomène. Mais il est erroné de dire qu'à l'iso-osmolarité, l'hématie est un osmomètre.

D'autre part, le transfert de solvant observable dans les plus forts déséquilibres concevables n'est toujours que partiel. Il y a dans les hématies une fraction de l'eau que les forces osmotiques ne peuvent extraire.

Enfin, les hématies qui ont perdu de l'eau par plasmolyse peuvent la récupérer en revenant aux conditions initiales, les courbes de variations de volume sont réversibles, le comportement osmotique des hématies est donc réel mais limité et inconstant.

II. - A l'iso-osmolarité la cinétique de diffusion vers les globules, des sulfates alcalins est une fonction exponentielle. L'étude théorique du phénomène fait intervenir deux coefficients de transfert, du plasma vers les globules et des globules vers le plasma ; leur rapport représente le rapport de distribution globulo-plasmatique de la substance étudiée.

Alors que la théorie prévoit que le rapport de distribution est indépendant de la concentration initiale en sulfate, l'expérience montre que ce rapport diminue avec la concentration lorsque $(SO_4) > 10$ mmol/l.

III. - Lorsque du sang, prélevé depuis peu de temps est enrichi en glucose et maintenu à 37°, les échanges de Na^+ et K^+ globaux observés résultent de mouvements passifs de diffusion s'effectuant dans le sens du gradient de concentration et de transfert actif s'exerçant contre le gradient de concentration.

Par comparaison avec les faits observés, après inhibition enzymatique, on peut calculer les valeurs du flux passif et du flux actif de Na^+ et K^+ ; les deux flux actifs sont augmentés si le sang est surchargé en K^+ ; leur liaison est ainsi mise en évidence.

Les faits couramment observés sont une résultante ; la complexité des échanges globulo-plasmatiques en est la cause. Le présent travail avait précisément pour but d'en faire l'analyse et de montrer qu'en se plaçant dans des conditions bien définies, chacune des trois composantes : osmose, diffusion, transfert actif, peut être mise - isolément - en évidence et mesurée.

BIBLIOGRAPHIE

36 - ABELS - non publié, signalé par PONDER (10)

70 - "Active transport and secretion" Cambridge Univ.Press, 1954

47 - ADAIR G.S. - Proc.Roy.Soc.A., 1928, 120, 573

54 - AMSDEN - in "Physical Chemistry for premedical students" 1950, p.102-103

67 - ANDERSEN B. et USSING - in Comparative Biochemistry vol.II p.571, Acad.press.N.Y., 1960

9 - BENEZECH C. - Thèse doctorat Sciences, Montpellier 1946

10 - BENEZECH C. - Extrait des rapports du III° Congrès Médical International d'Evian, 1951

11 - BLANCHARD K.C. - Cold.Spring.Harbor.Symp.quant.Biol. 1940, 8, 1

40 - BRODSKY W.A. REHMS W.S. et Mc INTOSH B.J. - J.Clin.Invest., 1953, 32, 556

74 - CIER J.F. - J.Physiologie, 1961, 53, 3

63 - CLARKSON E.N. et MAIZELS M. - J.Physiol. 1955, 129, 476

64 - CLARKSON E.N. et MAIZELS M. - J.Physiol. 1955, 129, 504

96 - CRASTES DE PAULET P., CRASTES DE PAULET A., BOUYARD P. - C.R.Soc.Biol. 1956, 60, 1607

16 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Bull.Soc.Chim. 1943, 10, 5

17 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Arch.Intern.Physiol. 1946, 54, 82

18 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Arch.Intern.Physiol. 1946, 54, 153

19 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Gaz.Med.France, 1947, 54, 699

20 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Bull.Soc.Sc.med.et biol. Montpellier, 1947

21 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Bull.Soc.Chim.Biol. 1946, 28, 168

22 - CRISTOL P. et BENEZECH C. - Journ.Physiol. 1948, 40, 160

76 - DANOWSKI - J.Biol.Chem. 1941, 139, 693

35 - DAVSON H. - Biochem.J. 1934, 28, 276

99 - DENSTEDT - The enzymology of the erythrocytes. Blood cells and plasma proteins. Acad.Press, 1953, p.213

42 - DICK D.A.T. - Exp.Cell.Research. 1958, 14, 608

43 - DICK D.A.T. - Proc.Roy.Soc.B. 1958, 149, 130

44 - DICK D.A.T. et LOWENSTEIN L.H. - J.Physiol, 1957, 138, 23 P

45 - DICK D.A.T. et LOWENSTEIN L.H. - Proc.Roy.Soc.B. 1958, 148, 241

46 - DRABKIN - J.Biol.Chem. 1950, 185, 231

66 - DUNKER E. et PASSOWS - Pflüg.Arch.ges.Physiol. 1953, 256, 446

92 - ECKEL R.E. - Amer.J.Physiol. 1954, 179, 632
3 - EGE R. - Biochem.Z. 1922, 130, 99
4 - EGE R. - Biochem.Z. 1922, 130, 116
5 - EGE R. - Biochem.Z. 1922, 130, 132
6 - EGE R. - Biochem.Z. 1922, 130, 166
12 - EGE R. - Biochem.J. 1927, 21, 967
97 - GARDOS G. - Acta Physiol.Hung. 1959, 15, 121
85 - GILL et SOLOMON A.K. - Nature, 1959, 183, 1127
80 - GLYNN I.M. - J.Physiol. 1954, 126, 35 P
81 - GLYNN I.M. - J.Physiol. 1956, 134, 278
86 - GLYNN I.M. - J.Physiol. 1957, 136, 148
23 - GOUGH A. - Biochem.J. 1924, 18, 202
52 - GRIJNS - Pflüg.Arch.f.d.ges.Physiol. 1896, 63, 86
1 - HAMBURGER H.J. - Arch.J.Anat.und Physiol. 1898, 317
2 - HAMBURGER H.J. - Osmotischer Druck end lonenlehre, Wiesbaden, 1902
29 - HAMBURGER H.J. - Z.Biol. 1889, 26, 414
30 - HAMBURGER H.J. - Biochem.Z. 1915, 71, 464
31 - HAMBURGER H.J. - Z.J.Physik.Chem. 6, 319
32 - HAMBURGER H.J. - Arch.Neerland de Phys. 1918, 2, 636
39 - HARRIS E.J. - Transport and accumulation in Biological system, 1956
75 - HARRIS E.J. - J.Biol.Chem. 1941, 141, 579
78 - HARRIS E.J. et MAIZELS - J.Physiol, 1951, 113, 506
88 - HARRIS E.J. et MAIZELS - J.Physiol, 1952, 118, 40
33 - HILL A.V. et KUPALOV - Proc.Roy.Soc.London, 1930, 106, 746
53 - HOBER - Physical Chemistry of cells and tissues, 1948, p.236
94 - HOUTSMULLER A.J. - Clin.Chim.Acta, 1959, 4, 606
69 - "Ion transport across membranes" Acad.Press.N.Y. 1954
49 - JACKSON et NUTT - J.Physiol, 1951, 115, 196
37 - JACOBS et PARPART - J.Cell.Comp.Physiol. 1937, 10, 247
24 - KREVISKY C. - Biochem.J. 1930, 24, 815
72 - "La méthode des indicateurs nucléaires dans l'étude des transports actifs d'ions" Pergamon Press 1959
83 - LING - Amer.J.Physiol. 1951, 167, 806
91 - LOVEW, CRONVICH et BYRGH G.E. - J.Clin.Invest. 1955, 34, 61
7 - LUCKE B. et CUTCHEON M. - Physiol.Rev. 1932, 12, 68
65 - LUCKWER H. - Arch für Physiol. 1938-9, 241, 753
55 - MAIZELS M. - Biochem.J. 1934, 28, 337
77 - MAIZELS M. - J.Physiol. 1949, 108, 247
28 - Mc LEOD J. et PONDER E. - J.Physiol. 1935, 86, 147
73 - "Minerals metabolism" Acad.Press N.Y. 1960
71 - MOREL F. - in "Equilibre Hydromineral de l'organisme et ses régulations" Colloques Nationaux du C.N.R.S.1953
82 - OSTERHOUT W.J.V. - Ergeb.Physiol.Exptl.Pharmkol 1933, 35,967
48 - PARPART et BALLANTINE - Sciences 1943, 98, 545
56 - PARPART A.K. - Cold Spring.Harb.Symp.Quant.Biol. 1940, 8, 25
59 - PASSOW - Abstracts of Communications to XX th international Physiologie, Bruxelles 1956
8 - PONDER E. - Cold Spring.Harb.Symp.Quant.Biol. 1940, 8, 123
25 - PONDER E. et SASLOW - J.Physiol, 1930, 70, 18

34 - PONDER E. et ROBINSON W. - Biochem.J. 1934, 28, 1943
38 - PONDER E. - Hemolysis and related phenomena. Grune et Stratton, N.Y. 1948
93 - POST et JOLLY - Biochem.Biophys Acta 1957, 25, 118
98 - RAKER, TAYLOR, WELLER, HASTINGS - J.Gen.Phys. 1950, 33, 691
58 - RICHMOND J.E. et HASTINGS A.R. - Am.J.Physiol. 1960, 199,821
68 - ROSENBERG - Symp.Soc.Exptl.Biol. 1954, 8, 27, N.Y.
50 - SACKUR - Zeituch Physick.Chem. 1910, 70, 477
95 - SCHATZMANN H.J. - Helv.Physiol.pharmacol.Acta 1953, 11, 346
13 - SCHIODT E. - Biochem.J. 1931, 25, 8
57 - SCHWEITZER C.H. et PASSOW H. - Arch.Für, Physiol. 1953, 256, 419
87 - SHAW I.J. - J.Physiol. 1955, 129, 464
51 - SIDEL V.W. et SOLOMON A.K. - J.Gen.Physiol. 1957, 41, 243
14 - SLAVINSKY A. - Journ.Chim.Physique, 1929, 26, 368
15 - SLAVINSKY A. - Journ.Chim.Physique, 1930, 27, 604
60 - SOLOMON A.K. - "Advances in Biological and Medical Physics" III, Acad.Press 1953
84 - SOLOMON A.K., GILL et GOLD G.L. - J.Gen.Physiol. 1956, 40, 327
89 - SOLOMON A.K. - J.Gen.Physiol, 1952, 36, 57
90 - SOLOMON A.K. - Annal. N.Y. Ac.Sc. 1958, 75, 175
26 - STEWARD C.N. - J.Physiol. 1899, 24, 356
27 - STEWARD C.N. - Am.J.Physiol. 1929, 90, 194
79 - TOSTESON in "Electrolytes in Biological systems" p.125 Ed. SHANS, 1955
61 - Van SLYKE, WU et Mc LEAN - J.Biol.Chem. 1923, 56, 765
62 - Van SLYKE, HASTINGS, MURRAY, SENDROS - J.Biol.Chem. 1925, 65, 701
100 - WILBRANDT W. - Pflüg.Arch. 1940, 243, 537
41 - WILLIAMS F.T. FOROHAM C.C. HOLLANDER, WELT L.C. - J.Clin. Invest. 1959, 38, 1587

TABLE DES MATIERES

Pages

Introduction générale 1

Première partie : PHENOMENES OSMOTIQUES 3

I. Introduction : Position du problème 4

II. Essai d'application de la loi de VAN T'HOFF aux hématies placées dans des solutions de NaCl d'osmolarité variable 9

III. Pression osmotique intra-globulaire et pression osmotique extra-globulaire : cas des solutions extérieures hypotoniques 14

IV. Réversibilité du comportement osmotique des hématies 17

V. Généralisation des résultats précédents : osmométrie comparée dans des solutions de divers électrolytes 21

VI. Limites du comportement osmotique des hématies 28

VII. Conséquences générales de l'étude du comportement osmotique des hématies 36

Deuxième partie : PHENOMENES DE DIFFUSION 38

I. Introduction 39

II. Le problème général de la diffusion et la diffusion globulo-plasmatique 41

III. Conditions d'étude de la diffusion globulo-plasmatique avec ^{35}S. 44

IV. Cinétique de la diffusion globulo-plasmatique des sulfates alcalins 47

V. Exploitation des résultats. Rôle de la concentration plasmatique initiale et du temps de contact dans le phénomène de pénétration globulaire. Evaluations des coefficients de transfert 52

VI. Etude du rapport de distribution de l'ion SO_4^{--} entre globules et plasma 58

VII. Mécanisme de la diffusion globulo-plasmatique des sulfates alcalins 63

VIII. Conclusion 68

Troisième partie : LES TRANSPORTS ACTIFS GLOBULO-PLASMATIQUES 70

I. Introduction : Notion de transport actif 71

II. Mise en évidence du transfert de l'ion K^+ et Na^+ contre leur gradient de concentration. Mesure du flux net 76

III. Inhibition de l'activité métabolique des globules rouges. Effets sur le transfert des ions K^+ et Na^+. Mesure des flux actifs 82

IV. Effets de la variation du gradient de concentration sur le mouvement passif et actif des ions K^+ et Na^+ 88

Annexe : Rôle éventuellement joué par l'anion associé au cation qui participe au transfert actif... 92

V. Conclusion 97

Conclusion générale 99

Bibliographie 101

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

EFFET DES RADIATIONS NON IONISANTES SUR LES MICRO-ORGANISMES

Vu et approuvé :

Paris, le 11 janvier 1962

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE